

# Das ESX-1 Sekretionscluster von *Streptococcus oralis* Uo5

Vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Tina Becker**

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 16.12.2011

Vorsitzender Promotionskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Kaiserslautern, 2011

D386

Research is the process of going up alleys to see if they are blind.

(Marston Bates)

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck angefertigt.

Hiermit erkläre ich, Tina Becker, die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Kaiserslautern, Oktober 2011

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Bakterielle Sekretionssysteme	3
2.1.1 Proteinsekretion in Gram-positiven Bakterien	4
2.2 Streptokokken – kommensale und pathogene Vertreter einer Gattung	15
2.2.1 Sekretionssysteme in Streptokokken	16
2.2.2 <i>Streptococcus oralis</i>	17
2.3 Zielsetzung	20
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1 Bakterienstämme	21
3.2 Verwendete Genomsequenzen	23
3.3 Vektoren und Plasmide	24
3.4 Oligonukleotide	24
3.5 Nährmedien	29
3.5.1 CpH8-Medium	29
3.5.2 D-Blutagar	30
3.5.3 LB-Medium und -Agar	31
3.5.4 Antibiotika	31
3.6 Wachstum und Konservierung von Bakterienstämmen	31
3.6.1 Wachstum in Flüssigmedium	31
3.6.2 Glyzerinkulturen	32
3.7 Mikroskopie	33
3.8 Transformation von <i>E. coli</i>	33
3.8.1 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	33
3.8.2 Transformation der chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.9 Transformation von <i>S. oralis</i>	34
3.9.1 Herstellung von <i>S. oralis</i> Uo5-Vorkulturen	35
3.9.2 Transformation von <i>S. oralis</i> -Vorkulturen	35
3.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
3.11 Isolierung von chromosomaler <i>S. oralis</i> -DNA	36
3.12 Isolierung von RNA aus <i>S. oralis</i>	37
3.12.1 Kultivierung und Ernte der Zellen	37
3.12.2 Zellaufschluss und Isolierung der RNA	38
3.12.3 DNaseI-Verdau	39
3.12.4 Aufreinigung von RNA	39
3.13 Quantifizierung von Nukleinsäuren	40
3.14 Agarose-Gelelektrophorese	41
3.15 Verdau von DNA	42
3.16 Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43

3.17.1	Kultur-PCR	43
3.17.2	Überlappende PCR	44
3.18	Reverse Transkription (RT)	44
3.19	RT-PCR	44
3.20	Quantitative realtime RT-PCR (qRT-PCR)	45
3.21	Northern Blot	46
3.21.1	Auftrennung der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	47
3.21.2	Auftrennung der RNA mittels denaturierender Polyacrylamid-Elektrophorese	47
3.21.3	Blotting der RNA	48
3.21.4	UV-Crosslinking	48
3.21.5	Detektion spezifischer RNA	48
3.22	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	50
3.23	Herstellung von <i>S. oralis</i> -Zelllysaten	50
3.24	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.25	Überexpression von Proteinen mithilfe eines GST- bzw. His <sub>6</sub> -tags	54
3.26	Umpufferung von Proteinen	57
3.27	Quantifizierung von Proteinen	57
3.27.1	Quantifizierung von Proteinen mittels Nanodrop	57
3.27.2	Quantifizierung von Proteinen mittels Bradford-Assay	57
3.28	Abspaltung des GST-tags mithilfe der PreScission Protease	58
3.29	Herstellung von Antiseren gegen EsxA und EsxB	59
3.29.1	Überprüfung der Antiseren gegen EsxA und EsxB	59
3.30	Western Blot	60
3.31	Gelfiltration	61
3.32	Protein-Interaktionsstudien mittels Dot Blot	62
3.33	Protein-Interaktionsstudien mittels Crosslink durch Glutaraldehyd	62
3.34	Protein-Strukturanalyse mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie	63
3.35	Konstruktion der Stämme mit Deletionen im ESX-1 Locus	64
3.35.1	Deletion von <i>esxB</i> in <i>S. oralis</i> Uo5 mittels Kanamycin-Resistenzkassette	64
3.35.2	Deletion von <i>esxA</i> , <i>essC</i> und <i>ter_esxA</i> in <i>S. oralis</i> Uo5 mittels Janus-Kassette	64
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66</b>
4.1	Aufbau des ESX-1 Sekretionssystems von <i>S. oralis</i> Uo5	66
4.2	Transkription des ESX-1 Sekretionsclusters von <i>S. oralis</i> Uo5	68
4.2.1	Ein Terminator zwischen <i>esxA</i> und <i>esaA</i> ?	69
4.2.2	Nachweis der ESX-1-Transkription in <i>S. oralis</i> Uo5 durch RT-PCR	70
4.2.3	Nachweis der Transkription einzelner Gene des ESX-1 Sekretionsclusters von <i>S. oralis</i> Uo5 mittels qRT-PCR und Northern Blot	72
4.3	Nachweis der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB von <i>S. oralis</i> Uo5	76
4.4	Der Transporter EssC und die Sekretion von EsxA und EsxB	80
4.5	Struktur, Stöchiometrie und Stabilität der WXG-100 Proteine von <i>S. oralis</i> Uo5	83
4.5.1	Bindung der WXG-100 Proteine von <i>S. oralis</i> Uo5 an Laminin	95
4.6	Einfluss diverser Deletionen im ESX-1 Cluster von <i>S. oralis</i> Uo5 auf Wachstum und Morphologie	96
4.7	Das ESX-1 Sekretionscluster in <i>Streptococcus</i> spp.	99
4.7.1	Verbreitung und Aufbau des ESX-1 Clusters in <i>Streptococcus</i> spp.	99

4.7.2	Das ESX-1 Sekretionscluster in diversen <i>S. oralis</i> -Stämmen	102
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>109</b>
5.1	Negativer Einfluss eines internen Terminators auf die Transkription des ESX-1 Sekretionsclusters von <i>S. oralis</i> Uo5	109
5.2	Die WXG-100 Proteine von <i>S. oralis</i> Uo5 – Substrate des ESX-1 Sekretionssystems	114
5.2.1	Detektion und Lokalisation der WXG-100 Proteine von <i>S. oralis</i> Uo5 <i>in vivo</i>	114
5.2.2	Die Rolle von EssC bei der Sekretion der WXG-100 Proteine von <i>S. oralis</i> Uo5	117
5.2.3	Eigenschaften der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB von <i>S. oralis</i> Uo5	120
5.3	Verbreitung, Aufbau und Evolution des ESX-1 Sekretionsclusters in <i>Streptococcus</i> spp.	123
5.3.1	Verbreitung des ESX-1 Sekretionsclusters innerhalb der Art <i>Streptococcus oralis</i>	123
5.3.2	Aufbau des ESX-1 Sekretionsclusters in <i>Streptococcus</i> spp.	124
5.3.3	Evolution des ESX-1 Locus in der Gattung <i>Streptococcus</i>	125
5.4	Ausblick	128
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>140</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>154</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>155</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro
A	Adenin
AA	Acrylamid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AU	Adsorption Unit
BAA	Bisacrylamid
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CD	Zirkulardichroismus
cDNA	copy DNA
CFP-10	culture filtrate protein 10 kDa
cfu	colony forming unit
cm	Centimeter
CMT	Cytolysin-mediated Translocation
CSP	competence stimulating peptide
DIG	Dioxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
esa	ESAT-6 secretion accessory
ESAT-6	early secreted antigenic target 6 kDa
ess	ESAT-6 secretion system
esx	Ess extracellular
ESX-1	ESAT-6 secretion system 1
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	SI Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Guanin
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
k	Kilo



Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
m	Milli
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mAU	milli Absorbance Units
mg	Milligramm
min	Minute
N(U)	Nephelo (Units)
n	Nano
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative realtime RT-PCR
RD-1	region of difference-1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotation per minute (Umdrehungen/min)
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
s	Sekunde
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus, S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>S. equi</i>	<i>Streptococcus equi</i>
<i>S. gallolyticus</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. oralis, S.o.</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. pneumoniae, S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Secretion
spp.	Spezies
Strep	Streptomycin
T	Thymin
tat	Twin-arginine-translocation
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Uracil

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Sekretionssysteme ermöglichen Bakterien nicht nur die Kommunikation mit ihrer Umwelt, sie spielen auch eine große Rolle in der Virulenz. Mit Virulenz werden auch Typ VII-Sekretionssysteme in Verbindung gebracht, die ausschließlich in Gram-positiven Bakterien vorkommen. Substrate dieser Systeme sind u.a. kleine Proteine mit einem zentralen WXG-Motiv, die sogenannten WXG-100 Proteine, die im gleichen Locus kodiert werden. Das ESX-1 System, das u.a. in *M. tuberculosis* und *S. aureus* vorkommt, ist ein bisher vor allem in diesen Organismen untersuchtes Typ VII-Sekretionssystem.

Im Gegensatz zu seinem pathogenen Verwandten *S. pneumoniae* besitzt *S. oralis* Uo5 Gene, die für ein ESX-1 Sekretionssystem kodieren. Bislang wurde ein solches System in Streptokokken nicht untersucht und es war unklar, ob dieses exprimiert wird und welche Funktion es in diesen Bakterien erfüllt.

Im Fokus dieser Arbeit stand nun die Charakterisierung des ESX-1 Sekretionssystems von *S. oralis* Uo5 und dessen Verbreitung in anderen Streptokokken. Dabei belegten Transkriptionsstudien, dass ein interner Terminator zwischen dem ersten und zweiten Gen (*esxA* und *esxA*) die Transkription negativ beeinflusst. Trotz der niedrigen Transkriptmenge der downstream des Terminators gelegenen Gene konnte die Funktionalität des Systems durch den Nachweis der beiden WXG-100 Proteine EsxA und EsxB im Cytoplasma und im Kulturmedium bestätigt werden. Der Nachweis der WXG-100 Proteine erfolgte mit Antiseren, die im Rahmen dieser Arbeit gegen die rekombinant hergestellten und aus *E. coli* isolierten WXG-100 Proteine generiert worden waren. Durch eine Deletion des Gens, das in anderen Organismen für eine FtsK/SpoIIIE-ATPase kodiert, wurde gezeigt, dass auch dieses Protein in *S. oralis* Uo5 für die Sekretion der WXG-100 Proteine essentiell ist.

Die Daten von CD-spektroskopischen Analysen lassen vermuten, dass EsxA und EsxB, wie in anderen Organismen bereits gezeigt, als lineare Proteine vorliegen, die hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices bestehen. Diese Daten zeigen auch, dass EsxA im Gegensatz zu EsxB eine höhere Stabilität besitzt. Durch die Kombination von Gelfiltration und Crosslinking-Experimenten mittels Glutaraldehyd konnte die Bildung von EsxA-Homodimeren bestätigt werden.

Mit Hilfe von Antikörpern konnte EsxA in einer Reihe von *S. oralis* Stämmen nachgewiesen werden; die Verbreitung des ESX-1 Systems konnte durch PCR-Analysen bestätigt werden.

Eine vergleichende Analyse bekannter Genomdaten *in silico* bestätigt, dass dieses Cluster in verschiedenen Streptokokken-Spezies vorkommt. Eine phylogenetische Analyse der Gene *esxA* und *essC* im Vergleich mit dem in allen Bakterien konservierten Gen *gyrA* verdeutlicht, dass das ESX-1 System als Teil des akzessorischen Genoms angesehen werden kann, das sich über horizontalen Gentransfer verbreiten kann.

In dieser Arbeit wird somit zum ersten Mal ein Typ VII-Sekretionssystem in Streptokokken untersucht. Die Charakterisierung auf molekularer Ebene legt einen Grundstein für die Erforschung der Rolle des ESX-1 Systems *in vivo*.

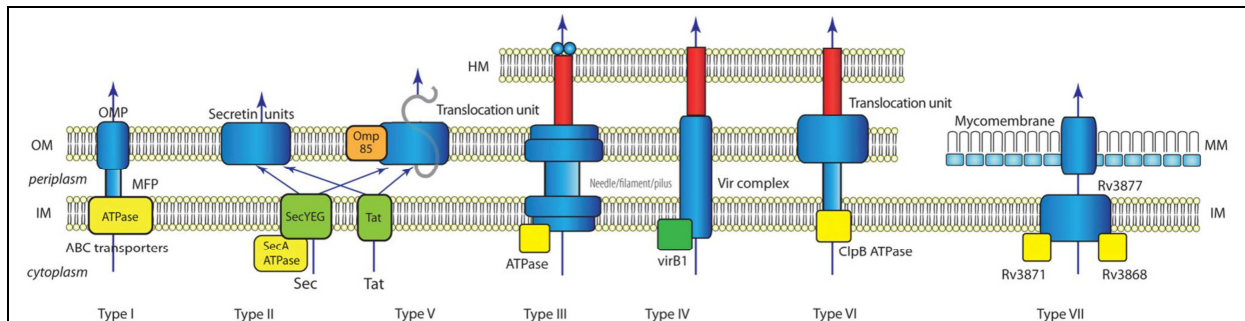
## 2 EINLEITUNG

Bakterien kommunizieren über vielfältige Wege mit ihrer Umwelt und beeinflussen diese, wodurch sie sich u.a. einen Vorteil bei der Kolonisierung eines Wirts bzw. der Persistenz in diesem verschaffen. Gram-positive Bakterien nutzen zur Sekretion meist das allgemeine Sec-Translocon. In einigen Spezies wurde allerdings das spezialisierte Typ VII-Sekretionssystem identifiziert, das spezifisch für Gram-positive Bakterien ist. Unter diesen Bakterien befindet sich auch die Gattung *Streptococcus*, wobei nur einzelne Arten über dieses Sekretionssystem verfügen. Mit der Sequenzierung des ersten *S. oralis*-Genoms wurde das Typ VII-Sekretionssystem auch in diesem Organismus entdeckt. Aber welche Funktion hat dieser Apparat, und welchen Vorteil haben Streptokokken-Stämme durch dieses Sekretionssystem gegenüber den Stämmen, die es nicht tragen? Bislang blieb die Beantwortung dieser Fragen offen, da das System bisher in Streptokokken nicht untersucht wurde. Die folgenden Kapitel geben Informationen über bakterielle Sekretionssysteme allgemein und speziell über das Typ VII-Sekretionssystem. Zusätzlich wird die Gattung *Streptococcus* beschrieben, mit der während dieses Projektes gearbeitet wurde.

### 2.1 Bakterielle Sekretionssysteme

Bakterien wachsen oft nicht planktonisch, sondern auch beispielsweise in Zellverbänden wie Biofilmen, wozu sie Adhesine exportieren müssen. Der Export von Substanzen, z.B. von Virulenzfaktoren wie Adhesinen, spielt auch bei der Kolonisierung eines Wirtes eine große Rolle. Sekretierte Virulenzfaktoren sind dabei wichtig für die Anheftung an die Wirtszelle oder die Schädigung dieser. Aber auch Proteine, die in die Zellwand oder Membran integriert werden, sowie solche, die zur Nahrungsaufnahme oder Fortbewegung dienen, müssen von Bakterien sekretiert werden. Dabei müssen die Proteine im einfachsten Fall (bei Gram-positiven Bakterien) über eine Membran und die Zellwand transportiert werden. Hinzu kommt die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien, in manchen Fällen ist auch ein Transport über die Wirtszellmembranen notwendig. Dabei müssen Bakterien zwischen cytoplasmatischen Proteinen und solchen, die exportiert werden sollen, unterscheiden. Die Proteine müssen zur Membran transportiert werden, wo viele Proteine im ungefalteten Zustand sekretiert wer-

den (Papanikou *et al.*, 2007). Deswegen gibt es in Bakterien diverse Sekretionswege. Bisher sind in Gram-negativen Bakterien sechs Sekretionssysteme beschrieben, von denen einige auch in Gram-positiven vorkommen (Tseng *et al.*, 2009).



**Abbildung 2.1: Bakterielle Sekretionssysteme**

In Gram-negativen Bakterien sind die Sekretionssysteme des Typs I – VI bekannt, Gram-positive nutzen ebenfalls einige dieser Systeme. Das Typ VII-Sekretionssystem ist spezifisch für Gram-positive Bakterien. Nach Tseng *et al.*, 2009.

HM: host membrane (Membran der Wirtszelle); OM: outer membrane (äußere Membran); IM: inner membrane (innere Membran); MM: mycomembrane (Mycomembran); OMP: outer membrane protein (äußeres Membranprotein); MFP: membrane fusion protein (Membranfusionsprotein); gelb: ATPasen und Chaperone

### 2.1.1 Proteinsekretion in Gram-positiven Bakterien

Die Sekretion in Gram-positiven Bakterien verläuft aufgrund des Fehlens einer äußeren Membran im Vergleich zu Gram-negativen weniger kompliziert. Das am besten untersuchte System ist dabei der Sec pathway, auf dem das Typ II-Sekretionssystem der Gram-negativen Bakterien aufbaut.

Bevor die Proteine bei diesem Mechanismus über die Membran transloziert werden können, werden sie im Cytoplasma translatiert. Das N-terminale Signalpeptid wird von Chaperonen oder bestimmten Proteinen gebunden, die diese hydrophobe Sequenz erkennen und verhindern, dass sich das neu translatierte Protein faltet. Dieser Komplex transportiert das zu exportierende Protein zur Membran, das dort an einen Rezeptor bindet, der seinerseits an die Exportmaschinerie bindet (Papanikou *et al.*, 2007). Die Translokase besteht aus den Proteinen SecY, SecE und SecG, die einen Kanal bilden, durch den das Protein exportiert wird, und SecA, einer ATPase, die den Transport katalysiert (Papanikou *et al.*, 2007). Nach dem Export

schneidet eine Signalpeptidase das Signalpeptid ab (Paetzel *et al.*, 2002) und das Protein kann sich korrekt falten.

Beim Twin-arginine-translocation (tat) pathway (Typ V) hingegen wird das Protein im gefalteten Zustand mit seinen Cofaktoren exportiert. Dabei werden die Proteine von der Translokationsmaschine an einem bestimmten hydrophoben Motiv in ihrem N-terminalen basischen Signalpeptid erkannt (Müller, 2005). Der Tat-Komplex besteht aus drei Untereinheiten, TatA, TatB und TatC, die in verschiedenen Mengenverhältnissen vorkommen. TatB und TatC sind für die Substraterkennung und –bindung zuständig (Alami *et al.*, 2003), TatA formt den Kanal (Gohlke *et al.*, 2005). Bei Gram-positiven Bakterien fehlt allerdings meist TatB (Jongbloed *et al.*, 2006).

Außerdem nutzen Gram-positive Bakterien YidC, dessen genaue Funktion noch nicht aufgeklärt ist. Wahrscheinlich kommt YidC eine wichtige Rolle bei der Aufteilung der exportierten Proteine in Membranproteine und sekretierte Proteine zu (Papanikou *et al.*, 2007).

Des Weiteren sekretieren Gram-positive Bakterien ihre Proteine über spezialisierte ABC-Transporter (Typ I) oder nutzen ein Typ IV-Sekretionssystem, das ähnlich der Konjugation funktioniert. Flagellen und Pili werden über spezielle Assemblierungssysteme aufgebaut (Mandlik *et al.*, 2008).

Spezifisch für Gram-positive Bakterien ist das Typ VII-Sekretionssystem, das seinen Namen 2007 erhielt (Abdallah *et al.*, 2007), entdeckt wurde es allerdings schon Jahre zuvor.

#### 2.1.1.1 Das Typ VII-Sekretionssystem

Das erste Typ VII-Sekretionssystem wurde in dem Gram-positiven Organismus *M. tuberculosis* beschrieben, der weltweit jeden dritten Menschen befällt und jährlich 2 Millionen Todesopfer fordert (Hingley-Wilson *et al.*, 2003). Entdeckt wurde dieses System durch den Vergleich des nicht virulenten Vakzinstammes *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) mit dem virulenten *M. tuberculosis* bzw. *M. bovis* (Mahairas *et al.*, 1996). Dabei wurden mehrere Regionen identifiziert, die dem Vakzinstamm fehlen, darunter die Region RD1 (region of difference 1). Spätere Versuche zeigten, dass RD1 verantwortlich für die eingeschränkte Virulenz von *M. bovis* BCG ist (Pym *et al.*, 2002, Lewis *et al.*, 2003). RD1 enthält Komponenten des ESX-1 Sekretionssystems (ESAT-6 secretion system).

Inzwischen ist bekannt (MacGurn *et al.*, 2005, Fortune *et al.*, 2005), dass zusätzliche Komponenten des ESX-1 Sekretionssystems von *M. tuberculosis* in einem zweiten genetischen Locus, dem *espA*-Locus, kodiert werden (Abbildung 2.3 zeigt das ESX-1 Cluster; hinzu kommt der *EspA*-Locus, der neben *EspA* zwei weitere Proteine unbekannter Funktion kodiert).

ESX-1 enthält die Gene, die für die WXG-100 Proteine ESAT-6 (early secreted antigenic target 6 kDa) und CFP-10 (culture filtrate protein 10 kDa) kodieren. WXG-100 Proteine sind ca. 100 Aminosäuren lang und besitzen ein zentrales WXG-Motiv (Pallen, 2002). ESAT-6 und CFP-10 werden in das das Bakterium umgebende Medium sekretiert (Sørensen *et al.*, 1995, Berthet *et al.*, 1998) und stellen, wie der Name von ESAT-6 impliziert, T-Zell-Antigene dar (Andersen *et al.*, 1995). Renshaw *et al.* (2002) zeigten, dass die beiden Proteine in *M. tuberculosis* einen stabilen 1:1 Komplex bilden, der durch hydrophobe Wechselwirkungen der beiden  $\alpha$ -Helices miteinander entsteht (Abbildung 2.4). Sie kommen also als Heterodimer vor.

Die Sekretion wird vermutlich von Rv3870 und Rv3871 bewerkstelligt, die jeweils eine FtsK/SpoIIIE-ATPase-Domäne besitzen (Pallen, 2002; Guinn *et al.*, 2004). Außerdem wurden viele Proteine identifiziert, die für die Sekretion essentiell sind (Abdallah *et al.*, 2007, Brodin *et al.*, 2006). ESAT-6 und CFP-10 können nur als Heterodimer exportiert werden, auch ihre Expression ist stark voneinander abhängig (Brodin *et al.*, 2006). Außerdem ist die Sekretion von ESAT-6 und CFP-10 zusätzlich von *EspA* (Rv3616c) abhängig, das zusammen mit dem Heterodimer sekretiert wird und an dieses binden kann (MacGurn *et al.*, 2005, Callahan *et al.*, 2010). Der Sekretionsmechanismus ist weiterhin unbekannt. Allerdings wurde identifiziert, dass das Heterodimer mit der FtsK/SpoIIIE-ATPase über den C-Terminus von CFP-10 und ESAT-6 interagiert (Champion *et al.*, 2006, Callahan *et al.*, 2010).

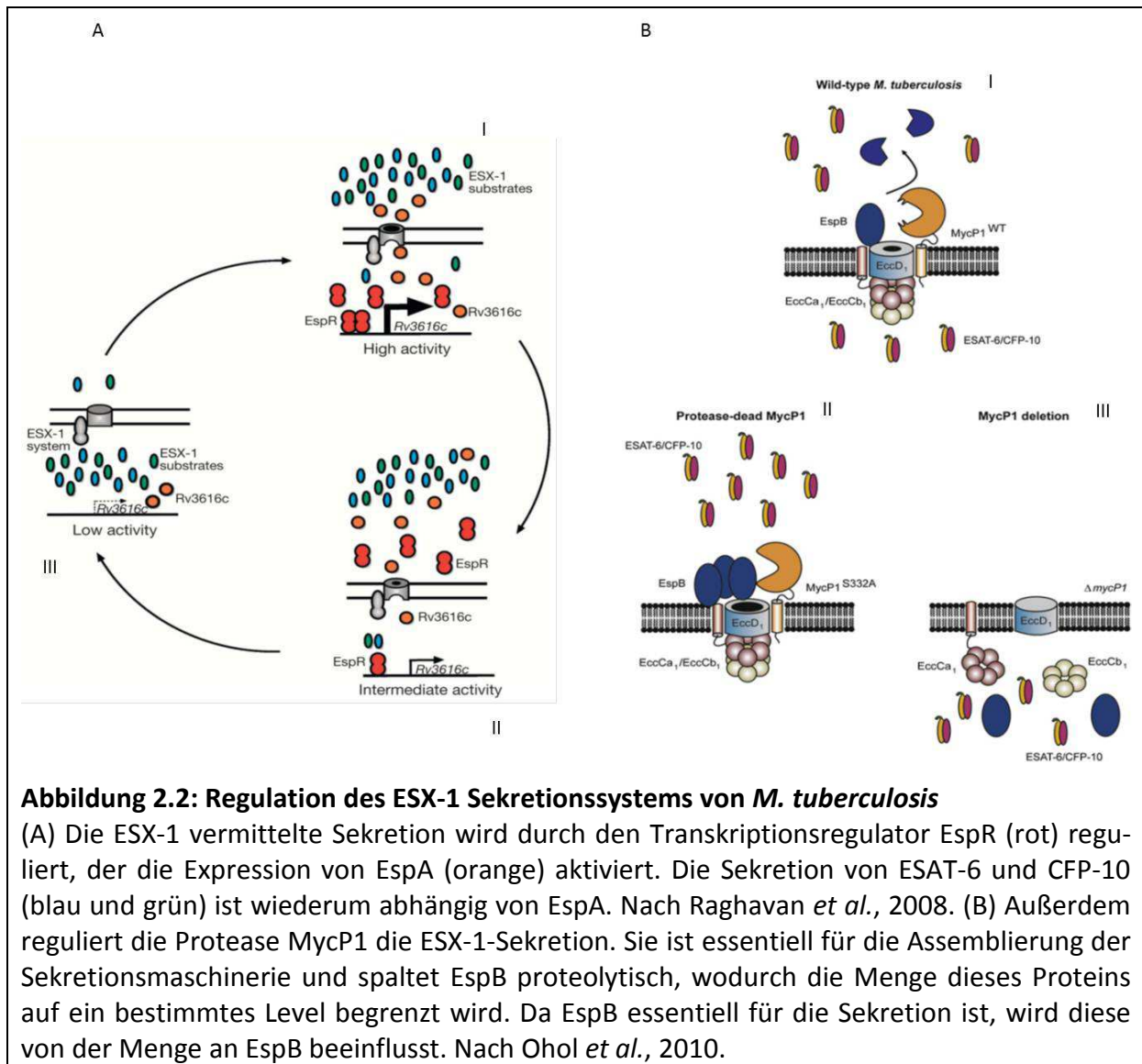
Inzwischen wurden drei Mechanismen beschrieben, die das ESX-1 Sekretionssystem von *M. tuberculosis* regulieren. Der Transkriptionsregulator PhoP aktiviert die Transkription einiger Komponenten, die für die Sekretion von ESAT-6 und CFP-10 essentiell sind (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008; Frigui *et al.*, 2008). Da es sich bei PhoP um einen universalen Regulator handelt, ist nicht bekannt, wovon diese Regulation abhängig ist.

Raghavan *et al.* (2008) identifizierten den Transkriptionsfaktor *EspR* (Rv3849), der innerhalb des ESX-1 Locus von *M. tuberculosis* kodiert wird. *EspR* aktiviert durch Bindung an den Promotor die Expression des *Rv3616c* – *Rv3614c*-Operons, wodurch die Menge an *EspA*

(Rv3616c) erhöht wird (I). Durch die erhöhte EspA-Menge wird die Sekretion der ESX-1-Substrate gefördert, darunter ESAT-6, CFP-10 und EspA. Da EspR selbst ebenfalls von ESX-1 sekretiert wird (II), entsteht auf diese Weise ein negativer Feedback-Loop, da somit die EspR-Menge in der Zelle wieder sinkt (III) (Abbildung 2.2 A).

Erst kürzlich wurde die Regulation von ESX-1 in *M. tuberculosis* über die Subtilisin-ähnliche Protease MycP1 (Rv3883c), die ebenfalls im ESX-1-Locus kodiert wird, untersucht (Ohol *et al.*, 2010). Abbildung 2.2 B oben (I) zeigt die Regulation über MycP1 im Wildtyp. Die Protease ist Teil des Sekretionsapparates und proteolysiert EspB, das als vollständiges Protein von ESX-1 sekretiert wird und essentiell für diese Sekretion ist. Somit stellt sich ein Gleichgewicht der Sekretion ein, da die Menge an EspB auf einem bestimmten Level gehalten wird. Hat das Protein keine Protease-Funktion (Abbildung 2.2 B II, links unten), findet eine verstärkte Sekretion statt, da EspB nicht proteolytisch gespalten wird und durch seine erhöhte Menge die Sekretion der ESX-1-Substrate fördert. Fehlt MycP1 allerdings, kann sich der Sekretionsapparat nicht assemblieren und es findet keine Sekretion statt (Abbildung 2.2 B III unten rechts).



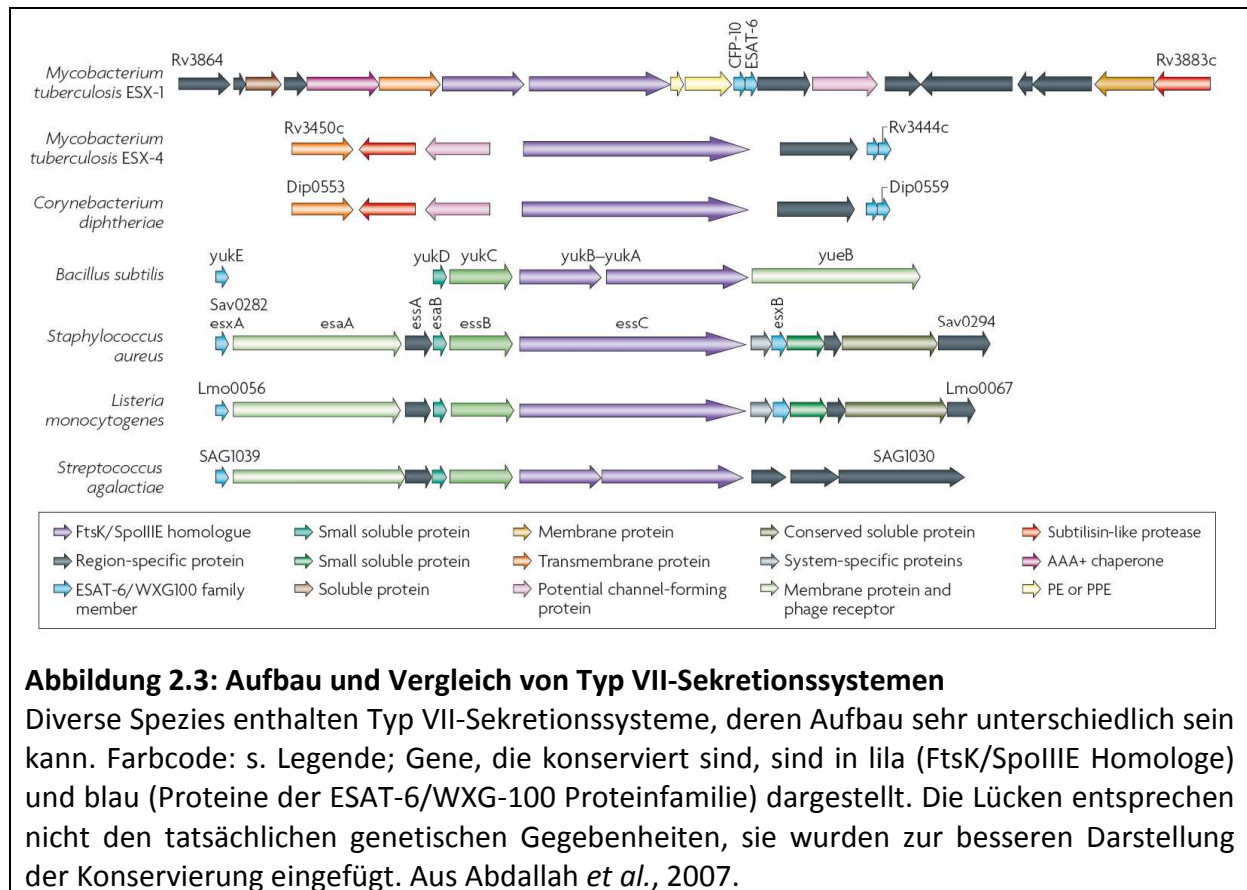


Doch warum wird ESX-1 durch mehrere Regulationsmechanismen so komplex kontrolliert? Virulenzdeterminanten stehen oft unter starker Kontrolle, da das Pathogen zwar den Wirt befällt, ihn aber nicht derart schädigen darf, dass dem Bakterium Nachteile entstehen. Dass ESX-1 eine Rolle bei der Virulenz von *M. tuberculosis* spielen könnte, wird kontrovers diskutiert. So wurde das System durch sein Fehlen im nicht virulenten *M. bovis* BCG entdeckt. Durch Komplementation mit ESX-1 wurde dieser Stamm wieder virulent, wodurch dem System eine Rolle als Virulenzdeterminante zugeschrieben wurde (Pym *et al.*, 2002). Inzwischen sind einige Virulenzmechanismen bekannt, bei denen die Beteiligung von ESX-1 bzw. den Substraten ESAT-6 und CFP-10 nachgewiesen worden ist. So wurde z.B. gezeigt, dass ESAT-6 bei der Verbreitung der Bakterien im Wirt eine große Rolle zukommt (Kinhikar *et al.*, 2010), indem *M. tuberculosis* über Oberflächen-gebundenes ESAT-6 an Laminin bindet, welches sich an der Oberfläche von Pneumocyten befindet. Auf diese frühe Infizierung von Pneumocyten

oder Epithelzellen folgt die Granulombildung, die mit einer Tuberkulose-Erkrankung einhergeht und ebenfalls von ESX-1 abhängig ist (Volkman *et al.*, 2004). Zur Granulombildung kommt es, indem *M. tuberculosis* durch ESAT-6 und ein Wirtsprotein (MMP9) Makrophagen rekrutiert und diese infiziert (Volkman *et al.*, 2010). In diesen Makrophagen kann das Bakterium aus dem Phagolysosom innerhalb der Makrophagen entkommen und durch seine Anwesenheit im Cytoplasma der Makrophagen weitere Makrophagen rekrutieren (Stamm *et al.*, 2003, van der Wel *et al.*, 2007). Dabei erfolgt die Cytolyse des Phagolysosoms durch ESAT-6, das unter sauren Bedingungen von CFP-10 dissoziiert, cytolytische Aktivität erlangt (de Jonge *et al.*, 2007) und so Poren in der Makrophagenmembran bildet (Smith *et al.*, 2008). Allerdings sind auch einige Spezies bekannt, in denen ESX-1 nachgewiesen wurde, die aber nicht virulent sind (Abdallah *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu gibt es auch virulente Spezies innerhalb der Mycobakterien, die aufgrund von Deletionen kein ESAT-6 sekretieren, weswegen die generelle Rolle von ESX-1 in der Virulenz von *M. tuberculosis* umstritten ist. Doch ESX-1 spielt nicht nur eine Rolle in der Virulenz, u.a. ist ESX-1 in die Konjugation von *M. smegmatis* involviert (Flint *et al.*, 2004).

In *M. tuberculosis* kommen neben ESAT-6 und CFP-10 noch weitere 11 – 12 Paare (je nach Stamm) von WXG-100 Proteinen vor, von denen sich insgesamt fünf in Typ VII-Sekretionsloci befinden (ESX-1 bis ESX-5). Nach Gey Van Pittius *et al.* (2001) sind diese verschiedenen Loci phylogenetisch durch Genduplikationen entstanden. Die Komplementation untereinander ist nicht möglich (Abdallah *et al.*, 2007). Auch die Funktionen der verschiedenen Typ VII-Systeme der Mycobakterien sowie deren Regulation können sich unterscheiden. So ist die Transkription von ESX-3 in *M. tuberculosis* z.B. Eisen- und Zink-abhängig (Rodriguez *et al.*, 2002, Maciag *et al.*, 2007).

Wie Typ VII-Sekretionssystemen in Gram-positiven Bakterien verbreitet sind, zeigt Abbildung 2.3.

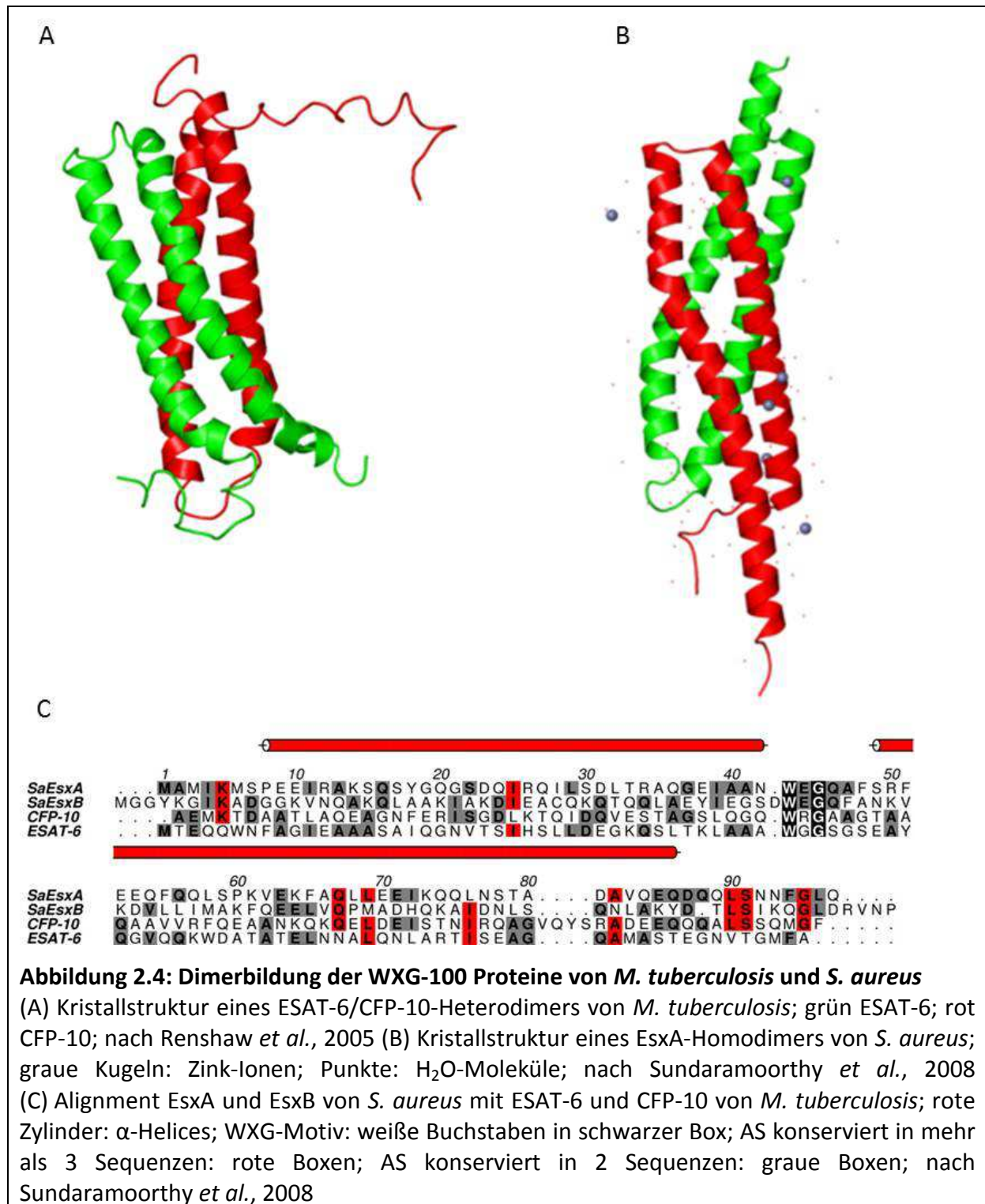


Das ESX-1 Sekretionssystem wurde inzwischen in vielen Spezies identifiziert, zu denen auch Vertreter der Firmicutes gehören. Diese Bakterien besitzen keine Mycomembran, womit widerlegt ist, dass es sich bei Typ VII-Sekretionssystemen um spezialisierte Systeme zur Sekretion von Proteinen über diese Mycomembran handelt. Allerdings ist die Funktion dieser Systeme in vielen Spezies noch unbekannt. In *Listeria monocytogenes* wurde festgestellt, dass das ESX-1 System nicht in die Virulenz involviert ist (Way *et al.*, 2005). Auch *Streptomyces coelicolor* besitzt ein Typ VII-Sekretionssystem (nicht in Abbildung 2.3 aufgeführt), dessen Aufbau keinem der dargestellten Systeme entspricht, am ehesten aber dem Aufbau des ESX-4 Systems von *M. tuberculosis* ähnelt. In *S. coelicolor* sind das ESX-1 Sekretionssystem und die sekretierten WXG-100 Proteine EsxA und EsxB wichtig für die Sporulation und fehlerfreie Sporenbildung. Dabei wird postuliert, dass das EsxA/EsxB-Heterodimer einen Schlüsselregulator reguliert, der die Expression der Gene steuert, deren Produkte für die Sporenbildung verantwortlich sind (Akpe San Roman *et al.*, 2010).

Einige Untersuchungen über ESX-1 wurden hingegen in *S. aureus* durchgeführt. Hier liegen die Gene der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB nicht unmittelbar nebeneinander, sondern

am 5'-Ende und in der Nähe des 3'-Endes des ESX-1 Locus (Abbildung 2.3). Der ESX-1 Locus von *S. aureus* enthält nach neuesten Erkenntnissen 11 Gene (Anderson *et al.*, 2011). Darunter befinden sich die Gene der beiden WXG-100 Proteine EsxA und EsxB, die aus der Zelle ins Medium exportiert werden. Die Energie für diesen Transport liefert die FtsK/SpoIIIE-ATPase EssC. Für die Sekretion sind zusätzlich die Membranproteine EssA, EssB und EsaD essentiell. Es wird vermutet, dass sie einen Translokationsapparat bilden. Zusammen mit EsxA und EsxB wird EsaC sekretiert.

Ein großer Unterschied zu *M. tuberculosis* besteht in der Dimerbildung von EsxA und EsxB, die in diesem Organismus als Homodimere vorliegen (Sundaramoorthy *et al.*, 2008 und Abbildung 2.4). Diese Dimerbildung geht auf starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den  $\alpha$ -Helices zurück. Sundaramoorthy *et al.* (2008) schlagen eine Rolle für EsxA bzw. für die WXG-100 Proteine als Adaptor-Proteine für den Transport von anderen Proteinen über die Zellhülle vor. Bei diesen Proteinen könnte es sich um Virulenzfaktoren oder Exotoxine handeln. Wie oben beschrieben sind zwar Proteine bekannt, die neben EsxA und EsxB bzw. ESAT-6 und CFP-10 durch Typ VII-Sekretionssysteme exportiert werden, allerdings handelt es sich hierbei nicht um die vorgeschlagenen Virulenzfaktoren oder Exotoxine, sondern eher um Proteine, die für die Sekretion der WXG-100 Proteine selbst wichtig sind (z.B. EspA).



EsxA und EsxB werden von *S. aureus* ebenfalls sekretiert, wofür EssC essentiell ist. EssC besitzt zwei FtsK/SpoIIIE-ATPase-Domänen, wovon eine für die Sekretion der WXG-100 Proteine benötigt wird (Burts *et al.*, 2005). Bei EssC handelt es sich also vermutlich um den Transporter bzw. einen Teil der Transportmaschinerie. Die Kristallstruktur wurde 2007 aufgeklärt, wonach EssC zwei Transmembrandomänen besitzt (Tanaka *et al.*, 2007). Im Stamm *S. aureus*

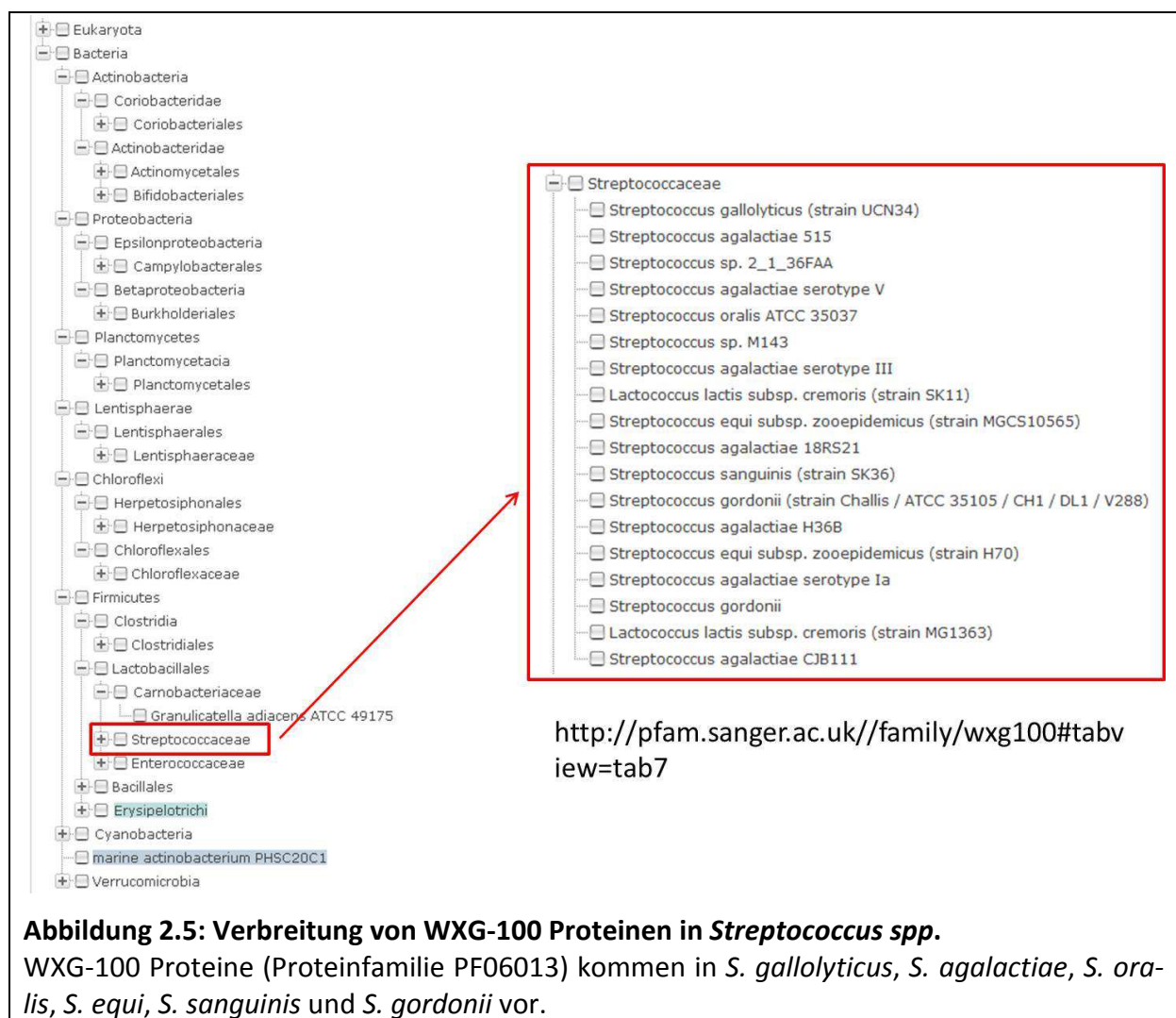
Newman konnten EsxA und EsxB lediglich im Medium, nicht im Zelllysat, nachgewiesen werden. Die beiden Proteine werden also zum größten Teil sekretiert. Deletionsversuche zeigten, dass neben EssC auch die putativen Membranproteine EssA und EssB sowie EsxA und EsxB selbst essentiell für Sekretion und Produktion der WXG-100 Proteine sind. Das Membranprotein EsaA und die beiden löslichen Proteine EsaB und EsaC sind dagegen nicht essentiell für die Produktion und Sekretion der WXG-100 Proteine (Burts *et al.*, 2005).

Allerdings spielen EsaB und EsaC eine regulatorische Rolle (Burts *et al.*, 2005). Wird der Stamm *S. aureus* Newman in Flüssigkultur angezogen, wird EsaC nicht exprimiert, da EsaB als posttranskriptioneller negativer Regulator für EsaC wirkt, wobei EsaB konstitutiv exprimiert wird. Wird dieser Stamm hingegen in der Anwesenheit von Serum kultiviert, wird EsaC produziert und über ESX-1 zusammen mit EsxA und EsxB sekretiert. Für die Sekretion von EsaC erwies sich EsxB als essentiell. Bei EsaC handelt es sich um ein stammspezifisches Protein, das zwar in allen *S. aureus*-Stämmen vorkommt, dessen Sequenz aber in den verschiedenen Stämmen sehr unterschiedlich ist. In klinischen Isolaten findet diese Regulation von EsaC über EsaB nicht statt.

Die Regulation durch EsaB erfolgt in *S. aureus* Newman auch für EsaD, welches kürzlich identifiziert wurde (Anderson *et al.*, 2011). Bei EsaD handelt es sich um ein Protein mit einer Transmembrandomäne, das an der Bakterienoberfläche detektiert werden kann. Das Gen *esaD* liegt drei Gene downstream von *esxB* und erweitert den ESX-1 Locus, der vor dieser Veröffentlichung *esxB* als letztes Gen im Locus beinhaltete. Aber nicht nur das cytosolisch lokalisierte EsaB, auch das Membranprotein EssB reprimieren *esaD*. Korrelierend mit EsaC wird auch EsaD unter Zugabe von humanem Serum vom Stamm *S. aureus* Newman produziert, klinische Isolate exprimieren EsaD auch unter Abwesenheit von Serum. Anderson *et al.* (2011) zeigten auch, dass EsaD wichtig für die Sekretion des WXG-100 Proteins EsxA ist, bei einer Deletion von EsaD akkumuliert EsxA im Cytoplasma. Diese Deletion sorgt auch für einen Virulenzdefizit im Mausmodell, wodurch EsaD eine Rolle in der Replikation und der Persistenz der Bakterien im Wirtsgewebe zugeschrieben wird.

Burts *et al.* (2005) wiesen die Rolle von ESX-1 in der Virulenz durch verringerte Abszessbildung von Stämmen mit ESX-1 Deletionen im Mausmodell nach. In Zusammenhang mit der regulierten Sekretion von EsaC wurde dessen Rolle in der Ausbildung anhaltender Infektionen gezeigt (Burts *et al.*, 2005).

Das ESX-1 System ist auch in *S. agalactiae* vorhanden, allerdings beruht diese Erkenntnis lediglich auf bioinformatischen Analysen. Kürzlich ergab eine solche Analyse, dass ESX-1 auch in *S. gallolyticus* vorkommt (Lin *et al.*, 2011), wobei allerdings das Gen eines WXG-100 Proteins, nämlich *esxB*, fehlt. Die folgende Abbildung zeigt, dass in verschiedenen Streptokokken-Arten WXG-100 Proteine annotiert sind, über die Vollständigkeit des ESX-1 Locus konnte bisher keine Aussage gemacht werden, da die Genprodukte oft als hypothetische Proteine annotiert sind. Die bioinformatische Analyse der ESX-1 Cluster dieser Streptokokken sollte deswegen in dieser Arbeit erfolgen.



Bis jetzt wurde dieses System in der Gattung *Streptococcus* nicht untersucht – das nachzuholen war das Ziel dieser Arbeit. Deswegen wird im Folgenden die Gattung *Streptococcus* und der Modellorganismus dieser Arbeit, *S. oralis* Uo5, vorgestellt.



## 2.2 Streptokokken – kommensale und pathogene Vertreter einer Gattung

Welcher Mikrobiologe hat nicht schon einmal etwas von der Gattung der Streptokokken gehört? Einige Berühmtheit erlangte *S. pneumoniae* durch die vielen Krankheitsbilder, die dieses Bakterium auslöst, sowie durch immer wieder auftretende neue Antibiotikaresistenzen. Auch die Entdeckung der Transformation bei Bakterien und der DNA als „transformierendes Prinzip“ haben wir diesem Bakterium zu verdanken, das sowohl Griffith (Griffith, 1928) als auch Avery (Avery *et al.*, 1944) für ihre frühen Experimente zu diesen Themen diente.

Die ersten Streptokokken wurden Ende des 19. Jahrhunderts isoliert und erhielten ihren heutigen Gattungsnamen von Billroth und Rosenbach (Rosenbach, 1884). Darunter befand sich auch die oben erwähnte Spezies *S. pneumoniae*, die von ihren Entdeckern George Miller Sternberg und Louis Pasteur zuerst als *Diplococcus pneumoniae* bezeichnet wurde.

Die Gattung *Streptococcus* enthält viele verschiedene Arten, die u.a. nach ihrem Hämolyseverhalten eingeteilt werden. Dabei unterscheidet man zwischen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Hämolyse. Das natürliche Habitat der Streptokokken ist der menschliche Körper, wo sie als Kommensale vorkommen und selten Krankheiten auslösen. Allerdings werden einige der bedeutendsten Krankheiten von Streptokokken verursacht, wie z.B. Karies (*S. mutans*), Scharlach und nekrotisierende Faszitis (*S. pyogenes*), Lungenentzündung und Meningitis (*S. pneumoniae*) sowie Endokarditis (*S. oralis*) (Hardie *et al.*, 1995).

Phylogenetisch sind Streptokokken den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt zuzuordnen, wo sie der Ordnung der Lactobacillen angehören. Diese Bakterien gewinnen ihre Energie mittels homofermentativer Milchsäuregärung, weswegen sie auch zu den anaeroben bzw. aerotoleranten Bakterien gehören. Da Streptokokken viele Stoffwechselwege fehlen, sind sie auf sehr komplexe Medien angewiesen (Hardie *et al.*, 1995). Sie wachsen als Diplokokken oder in kurzen Ketten aus 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$  großen Kokken, woher sie auch ihren Namen haben.



### 2.2.1 Sekretionssysteme in Streptokokken

Da Streptokokken viele Stoffwechselwege fehlen, sind sie auf die Aufnahme zahlreicher Substanzen angewiesen. Aus diesem Grund werden vor allem Proteine mit Enzymaktivität sekretiert, die Nährstoffe zugänglich machen. Außerdem werden Peptide exportiert, die wichtig für die Interaktion und Kommunikation mit dem Wirt oder anderen bakteriellen Spezies sind (Caparo *et al.*, 2007). Besonders wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die Sekretion von Virulenzfaktoren, die z.B. die Kolonisierung des Wirtes ermöglichen.

Wie auch bei anderen Gram-positiven Bakterien nutzen Streptokokken hauptsächlich den generellen Sec pathway, der eine Grundlage für das Typ II-Sekretionssystem der Gram-negativen Bakterien bildet (Kapitel 2.1.1) und durch den Proteine im ungefalteten Zustand exportiert werden. Im Vergleich mit dem Typ II-Sekretionssystem der Gram-negativen Bakterien sind einige Komponenten bei Streptokokken nicht essentiell oder fehlen, die in Gram-negativen essentiell sind oder für die Steuerung der Peptide zum Sec-Translocon zuständig sind (Kremer *et al.*, 2001, Hasona *et al.*, 2005). In einigen Streptokokken kommen zwei Kopien der ATPase SecA und einer Untereinheit des Transportkanals SecY vor. Wahrscheinlich sind diese Proteine wichtig für die Sekretion von glycosylierten Adhesinen (Chen *et al.*, 2004).

Ein interessantes Sekretionssystem, das auch in Streptokokken vorkommt, ist das Cytolysin-mediated Translocation (CMT) System, das mit dem Typ III-Sekretionssystem der Gram-negativen Bakterien verglichen werden kann. Dabei ist der Kontakt zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle essentiell, der exakte Weg der Translokation von Signalmolekülen in das Wirts-Cytosol ist aber bisher unbekannt. Abhängig ist dieses System von Cytolysinen, die das Bakterium durch den Sec pathway exportiert. Beispiele für diese Cytolysine sind Pneumolysin von *S. pneumoniae* oder Streptolysin O von *S. pyogenes*, die eine Signalantwort des Wirtes bewirken (Hamon *et al.*, 2007). Diese Cytolysine bilden zusätzlich Poren in der Membran der Wirtszelle, die aber nicht essentiell für die Translokation der sog. Effektormoleküle sind (Magassa *et al.*, 2010).

Für den Export kleinerer Moleküle aus Streptokokken ist ein weiterer Weg von Bedeutung. Dabei werden kleine Peptide mit Doppel-Glycin-Motiv (Håvarstein *et al.*, 1994) und N-terminalem Leader-Peptid über ABC-Transporter sekretiert. Diese ABC-Transporter sind meistens spezialisiert auf bestimmte Peptide, die oft auch mit den Transportern cotranskri-

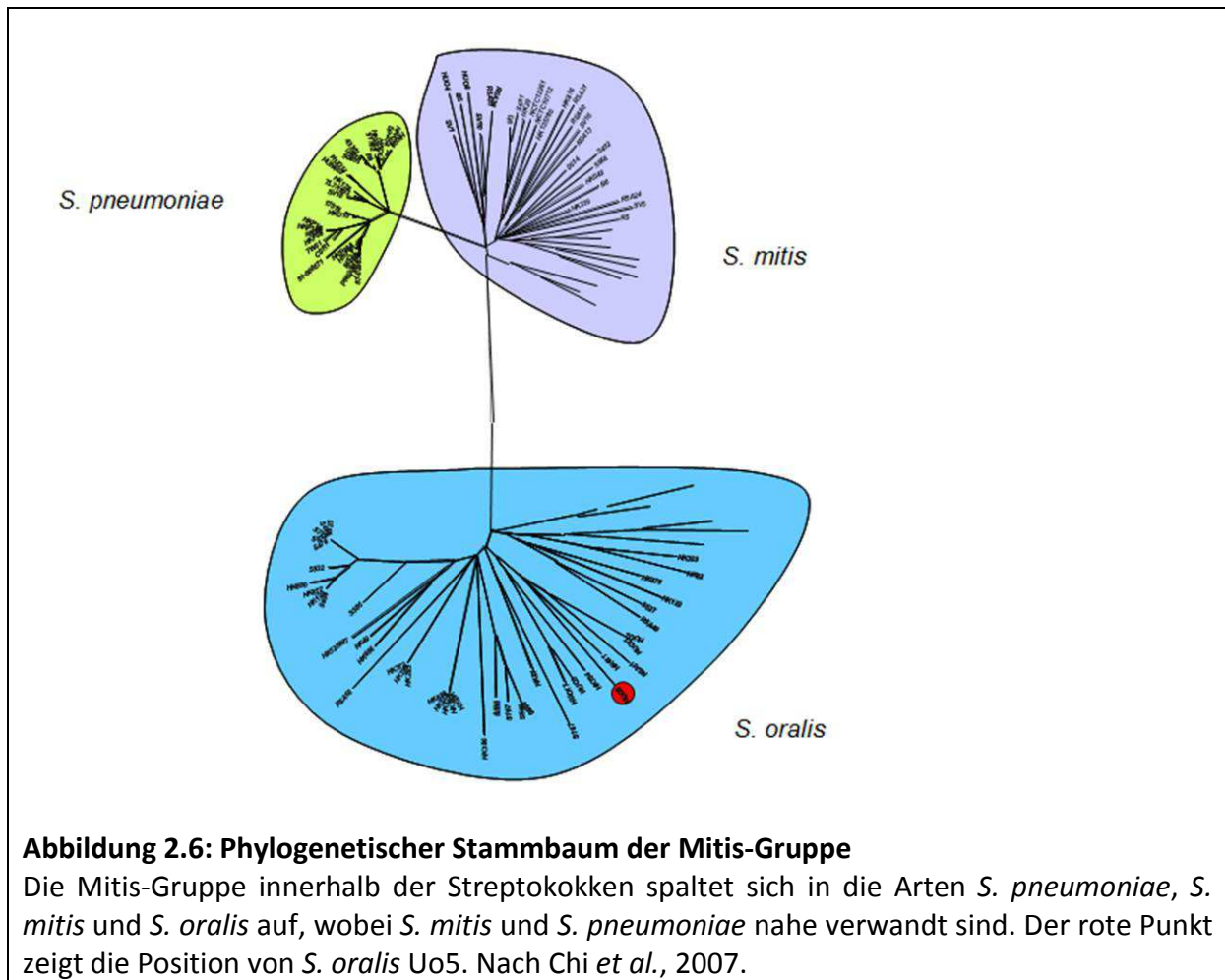
biert werden. Diese Transporter führen die posttranslationelle Modifikation der sekretierten Proteine durch, bei der das N-terminale Leader-Peptid zur Herstellung der biologischen Aktivität entfernt wird. Beispiele sind der Bacteriocinexport (Håvarstein *et al.*, 1995b) oder das Kompetenzpheromon CSP und sein ABC-Transporter ComAB (Hui *et al.*, 1995, Håvarstein *et al.*, 1995a).

### 2.2.2 *Streptococcus oralis*

In diesem Kapitel wird der Modellorganismus der vorliegenden Arbeit, *S. oralis* Uo5, vorgestellt.

Zu den weniger bekannten Vertretern der Streptokokken gehört die Art *S. oralis*, die Gegenstand dieser Arbeit war. Wächst *S. oralis* auf Blutagar-Platten, tritt eine Vergrünung des Agars um die Kolonien auf, die durch die Lyse der Erythrozyten entsteht. Aus diesem Grund zählt *S. oralis* zu den Vertretern der  $\alpha$ -hämolytischen Streptokokken.

*S. oralis* gehört zusammen mit *S. mitis*, einem nahen Verwandten von *S. pneumoniae*, und *S. pneumoniae* selbst, zur Mitis-Gruppe der Streptokokken. Diese Gruppe kolonisiert die oberen respiratorischen Atemwege des menschlichen Körpers (Kilian *et al.*, 2008), wo *S. oralis* gewöhnlich als Kommensaler auftritt. Allerdings kann *S. oralis* eine Endokarditis verursachen. Es wird angenommen, dass *S. pneumoniae* ein Klon von *S. mitis* darstellt (Denapate *et al.*, 2010) und *S. oralis* eine eigenständige Gruppe (Chi *et al.*, 2007).



2011 wurde die Genomsequenz von *S. oralis* Uo5 als erste vollständige *S. oralis*-Sequenz veröffentlicht (Reichmann *et al.*, 2011). Mit einer Größe von 1,96 Mbp ist das Genom kleiner als die bisher bekannten Genome der anderen Vertreter der Mitis-Gruppe. *S. oralis* Uo5, ein multiresistenter Vertreter seiner Art, wurde zwischen 1991 und 1992 in Ungarn aus einem Nasenabstrich isoliert, konnte allerdings nicht mit einer Infektion in Verbindung gebracht werden. Der Stamm wurde erstmals bei Reichmann *et al.* (1997) beschrieben, wo er als *S. oralis* Hu5 benannt ist.

Die genetischen Veränderungen, die in dieser Arbeit vorgenommen wurden, waren möglich, da *S. oralis* Uo5 Kompetenz aufweist. Laut genetischer Ausstattung handelt es sich bei allen Vertretern der Mitis-Gruppe um natürlich kompetente Bakterien; ihre Kompetenz unter Laborbedingungen ist allerdings sehr variabel ausgeprägt (Johnsborg *et al.*, 2007). Die natürliche Kompetenz wird über das ComABCDE-System vermittelt, bei dem es sich um ein Quorum-Sensing-System handelt. CSP (competence stimulating peptide) bindet an die Histidin-

kinase ComD des Zweikomponentensystems ComDE, die wiederum den Response Regulator ComE durch Phosphorylierung aktiviert (Pestova *et al.*, 1996). Dieser reguliert die Expression der frühen und späten Kompetenzgene. Unter den frühen Kompetenzgenen befindet sich u.a. *comCDE* selbst, was zu einer autokatalytischen Regulation des Systems führt, und *comX1* und *comX2*, die für den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^X$  kodieren (Ween *et al.*, 1999). Die Expression der späten Kompetenzgene wird von diesem Sigmafaktor kontrolliert. Darunter befinden sich Gene, deren Produkte u.a. in Transformation und Lyse verwickelt sind (Peterson *et al.*, 2004 und Dagkessamanskaia *et al.*, 2004).

Diese natürliche Kompetenz ist dafür verantwortlich, dass Streptokokken DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen und homologe Sequenzen in ihr Genom rekombinieren können. Schon vor über 50 Jahren wurde am Beispiel der Übertragung von Antibiotikaresistenzen von Viridans-Streptokokken auf *S. pneumoniae* gezeigt, dass dieser sog. horizontale Gentransfer möglich ist (Bracco *et al.*, 1957). In den folgenden Jahren wurden unzählige Beispiele von horizontalem Gentransfer beschrieben und dieser umfangreich untersucht. In ihrem natürlichen Habitat ist der genetische Pool einer Art, der die DNA enthält, die dieser Art zur Transformation zur Verfügung steht, auf DNA der Spezies beschränkt, die die gleiche Nische bewohnen. *S. pneumoniae* und *S. oralis* besiedeln das gleiche Habitat und viele Studien weisen die Übertragung von Antibiotikaresistenzdeterminanten von u.a. *S. oralis* auf *S. pneumoniae* nach (z.B. Chalkley *et al.*, 1991, Sibold *et al.*, 1994, Reichmann *et al.*, 1997). Da *S. pneumoniae* als Pathogen und auch aufgrund seiner vielen Resistenzen gegen Antibiotika sehr ernst zu nehmen ist, besteht ein großes Interesse an der Aufklärung der Evolution dieser Resistenzdeterminanten. So stellte die Veröffentlichung des ersten *S. oralis*-Genoms ein neues Werkzeug zur Erforschung dieser Fragen zur Verfügung.

Doch die Veröffentlichung dieses Genoms warf auch neue Fragen auf. So wurde z.B. ein Sekretionscluster entdeckt, das weder aus *S. pneumoniae* noch aus *S. mitis* bekannt war. Und neben den schon identifizierten Resistenzdeterminanten, die Gegenstand von horizontalem Gentransfer sind, ist vor allem die Erforschung unbekannter Gene oder Systeme von großem Interesse. Theoretisch ist es möglich, dass auch dieses Cluster durch die rasante Evolution der Bakterien in naher Zukunft durch horizontalen Gentransfer auf *S. pneumoniae* oder einen anderen Vertreter der pathogenen Streptokokken übertragen werden kann bzw. den Streptokokken-Arten, in denen dieses System schon vorhanden ist, einen Vorteil verschafft. Da es sich bei ESX-1 um ein System handelt, das z.B. bei *M. tuberculosis* mit Virulenz

in Verbindung gebracht wird (s.o.), wurde das Sekretionssystem ESX-1 zum Gegenstand dieser Arbeit.

## 2.3 Zielsetzung

Das Typ VII-Sekretionssystem kommt nur in Gram-positiven Bakterien vor, wo es zuerst in *M. tuberculosis* entdeckt wurde (Mahairas *et al.*, 1996). Das ESX-1 Cluster, ein Typ VII-Sekretionssystem, wurde inzwischen in einigen Spezies untersucht, darunter auch *S. aureus*. In *S. oralis* Uo5, dessen Genomsequenz kürzlich entschlüsselt wurde (Reichmann *et al.*, 2011), wurde die Sequenz eines ESX-1 Clusters identifiziert, dessen Aufbau dem ESX-1 Cluster von *S. aureus* ähnelt.

In dieser Arbeit sollte die Funktion dieses Clusters untersucht werden. Zunächst sollten Transkriptionsstudien durchgeführt werden, wobei ein großes Interesse auf dem Einfluss des intergenen Bereiches der ersten beiden Gene (*esxA* und *esxA*) lag. Dabei sollte analysiert werden, ob es sich bei diesem Sequenzabschnitt um einen putativen Terminator handelt.

Die beiden WXG-100 Proteine EsxA und EsxB sollten als rekombinante Proteine isoliert werden, um Antiseren gegen diese Proteine gewinnen zu können. Mit diesen Antiseren sollten die Mengen von EsxA und EsxB in der Zelle und im Wachstumsmedium nachgewiesen werden, um eine Aussage über die Sekretion machen zu können. Durch die Herstellung einer Deletionsmutante in *essC* sollte die Funktion von EssC bei der Sekretion analysiert werden, da diese FtsK/SpoIIIE-ATPase in anderen Organismen vermutlich die Energie für die Sekretion der WXG-100 Proteine liefert. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Aufklärung von Struktur, Stöchiometrie und Stabilität der rekombinanten WXG-100 Proteine. Hier stellte sich die Frage, ob die beiden Proteine korrelierend mit *S. aureus* als Homodimere vorkommen (Sundaramoorthy *et al.*, 2008).

In insgesamt sechs Streptokokken-Spezies sind WXG-100 Proteine annotiert, es liegt aber keine Information über ESX-1 Cluster in diesen Organismen vor. Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine bioinformatische Analyse des ESX-1 Systems dieser Stämme. Auch die Verbreitung von EsxA in klinischen *S. oralis*-Stämmen wurde mithilfe immunologischer Analysen untersucht.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Bakterienstämme

In Tabelle 3.1 sind alle klinischen Streptokokken-Isolate aufgeführt, die verwendet wurden. *S. oralis* Uo5 diente als Ausgangsstamm für die in dieser Arbeit konstruierten und in Tabelle 3.2 aufgelisteten Stämme. Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 zeigen die verwendeten *S. pneumoniae*- und *E. coli*-Stämme.

Tabelle 3.1: Verwendete klinische Streptokokken-Isolate

Stamm	Ort	Jahr	Referenz / Herkunft
<b><i>S. oralis</i> Uo5</b>	Ungarn	1991-92	Reichmann <i>et al.</i> , 1997 (hier Hu5 genannt)
<b><i>S. oralis</i> ATCC 35037</b>			Daugherty <i>et al.</i> , 2010
<b><i>S. oralis</i> Uo2</b>	Ungarn	1991-92	Reichmann <i>et al.</i> , 1997
<b><i>S. oralis</i> Uo7</b>	Ungarn		A. Marton, Budapest
<b><i>S. oralis</i> Uo9</b>	Ungarn		A. Marton, Budapest
<b><i>S. oralis</i> Uo11</b>	Ungarn		A. Marton, Budapest
<b><i>S. oralis</i> Uo12</b>	Ungarn	1990-92	Hakenbeck <i>et al.</i> , 2001
<b><i>S. oralis</i> Uo14</b>	Ungarn	<1992	Chi <i>et al.</i> , 2007
<b><i>S. oralis</i> Uo16</b>	Ungarn	1990-92	Hakenbeck <i>et al.</i> , 2001
<b><i>S. oralis</i> P19</b>	Frankreich	2000	D. Guillemot, BIO VSM Laboratoires, Paris
<b><i>S. oralis</i> P22</b>	Frankreich	2000	D. Guillemot, BIO VSM Laboratoires, Paris
<b><i>S. oralis</i> P41</b>	Frankreich	2000	D. Guillemot, BIO VSM Laboratoires, Paris
<b><i>S. oralis</i> P42</b>	Frankreich	2000	D. Guillemot, BIO VSM Laboratoires, Paris
<b><i>S. oralis</i> S197</b>	Spanien	1993	Carratalá <i>et al.</i> , 1995
<b><i>S. oralis</i> S476</b>	Spanien	1993	Carratalá <i>et al.</i> , 1995
<b><i>S. oralis</i> S510</b>	Spanien	1993	Bergmann, 2003
<b><i>S. oralis</i> S621</b>	Spanien	1993	Chi <i>et al.</i> , 2007
<b><i>S. oralis</i> S711</b>	Spanien	1993	Chi <i>et al.</i> , 2007
<b><i>S. oralis</i> RSA40</b>	Südafrika	1989-90	Chi <i>et al.</i> , 2007
<b><i>S. oralis</i> SA24</b>	Südafrika	1986-87	Chi <i>et al.</i> , 2007
<b><i>S. oralis</i> SA65</b>	Südafrika		Chalkley <i>et al.</i> , 1991
<b><i>S. oralis</i> SA67</b>	Südafrika		Chalkley <i>et al.</i> , 1991
<b><i>S. oralis</i> SA68</b>	Südafrika		Chalkley <i>et al.</i> , 1991
<b><i>S. mitis</i> M3</b>	Südafrika	1986-87	Chalkley <i>et al.</i> , 1991

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit konstruierte Derivate von *S. oralis* Uo5

Stamm	Genotyp	Phänotyp
<b>Uo5 str41</b>	K56T in RpsL	Sm <sup>r</sup>
<b>Uo5 <i>esxA::Jan</i></b>	<i>esxA::Janus</i>	Kan <sup>r</sup> , Sm <sup>s</sup>
<b>Uo5 <math>\Delta</math>esxA</b>	$\Delta$ esxA (Minigen)	Kan <sup>s</sup> , Sm <sup>r</sup>
<b>Uo5 <i>ter_esxA::Jan</i></b>	<i>ter_esxA::Janus</i>	Kan <sup>r</sup> , Sm <sup>s</sup>
<b>Uo5 <math>\Delta</math>ter_esxA</b>	$\Delta$ ter_esxA	Kan <sup>s</sup> , Sm <sup>r</sup>
<b>Uo5 <i>esxB::aphIII</i></b>	<i>esxB::aphIII</i>	Kan <sup>r</sup>
<b>Uo5 <math>\Delta</math>esxA <i>esxB::aphIII</i></b>	$\Delta$ esxA <i>esxB::aphIII</i>	Kan <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>
<b>Uo5 <i>essC::Jan</i></b>	<i>essC::Janus</i>	Kan <sup>r</sup> , Sm <sup>s</sup>
<b>Uo5 <math>\Delta</math>essC</b>	$\Delta$ essC (Minigen)	Kan <sup>s</sup> , Sm <sup>r</sup>

Tabelle 3.3: Verwendete *S. pneumoniae*-Stämme

Stamm	Phänotyp	Genotyp	Referenz
<b>RKL242</b>	Strep <sup>r</sup>	<i>rpsL41</i>	Salles <i>et al.</i> , 1992
<b>R6 <i>ciaR::janus</i></b>	Sm <sup>s</sup> , Kan <sup>r</sup>	<i>ciaR::janus</i>	Schmitt, 2006

Tabelle 3.4: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<b><i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	<i>supE44</i> $\Delta$ ( <i>lac</i> )U169 ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>endA1</i> <i>gyrA46</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>thi-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<b><i>E. coli</i> JM109</b>	<i>recA1</i> <i>supE44</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> <i>gyrA46</i> <i>relA1</i> <i>thi</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) F' [ <i>traD36</i> <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

### 3.2 Verwendete Genomsequenzen

Die folgende Tabelle zeigt alle verwendeten Genomsequenzen einschließlich Accession Numbers.

Tabelle 3.5: Verwendete Bakteriengenome

Genom	Accession Number	Referenz
<i>S. oralis</i> Uo5	NC_015291	Reichmann <i>et al.</i> , 2011
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	NZ_AEDW0100000	Shotgun sequence (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria_DRAFT/Streptococcus_oralis_ATCC_35037_uid53033/)
<i>S. pneumoniae</i> R6	NC_003098	Hoskins <i>et al.</i> , 2001
<i>S. mitis</i> B6	NC_013853	Denapaité <i>et al.</i> , 2010
<i>S. agalactiae</i> 2603 V/R	NC_004116	Tettelin <i>et al.</i> , 2002
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> MGCS10565	NC_011134	Beres <i>et al.</i> , 2008
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC 43143	AP012053	Lin <i>et al.</i> , 2011
<i>S. gordonii</i> Challis substr CH1	NC_009785	Vickerman <i>et al.</i> , 2007
<i>S. sanguinis</i> SK36	NC_009009	Xu <i>et al.</i> , 2007
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> str. Newman	NC_009641	Baba <i>et al.</i> , 2008
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> USA300_TCH1516	NC_010079	Highlander <i>et al.</i> , 2007



### 3.3 Vektoren und Plasmide

In der folgenden Tabelle sind alle Vektoren und Plasmide aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet bzw. konstruiert wurden.

Tabelle 3.6: Verwendete Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	Selektion	Anmerkungen	Referenz
<b>pQE-80L-Kan</b>	25 µg/ml Kana-mycin	Vektor zur Überexpression von N-terminalen His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen	Qiagen
<b>pGEX-6P-1</b>	100 µg/ml Ampicillin	Vektor zur Überexpression von N-terminalen GST-Fusionsproteinen	GE Healthcare; GenBank: U78872.1
<b>pQE-80L-Kan His<sub>6</sub>EsxA</b>	25 µg/ml Kana-mycin	<i>esxA</i> aus Uo5 über <i>Bam</i> HI und <i>Sal</i> I kloniert	diese Arbeit
<b>pGEX-6P-1 EsxB</b>	100 µg/ml Ampicillin	<i>esxB</i> aus Uo5 über <i>Bam</i> HI und <i>Sal</i> I kloniert	diese Arbeit
<b>pGEX-6P-1 EsxAEsxA</b>	100 µg/ml Ampicillin	2 Kopien von <i>esxA</i> aus Uo5 über <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI und <i>Sal</i> I kloniert	diese Arbeit
<b>pUC <i>aphIII</i></b>	200 µg/ml Kanamycin	Kan <sup>r</sup> durch <i>aphIII</i> der Janus-Kassette	Patrick Marx, unveröffentlicht

### 3.4 Oligonukleotide

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Oligonukleotide, die in Tabelle 3.7 - Tabelle 3.17 angegeben sind, von Eurofins MWG Operon im Reinheitsgrad „salzfrei“ bezogen.

Aus den lyophilisiert gelieferten Oligonukleotiden wurden Stammlösungen von 100 pmol/µl in TE (Tabelle 3.23) hergestellt und 1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt als Primer-Gebrauchslösungen für PCR (3.17) verwendet.

Tabelle 3.7: Oligonukleotide zur Überexpression von Proteinen des ESX-1 Clusters aus *S. oralis* Uo5

Primer	Sequenz 5'-3'	Schnittstelle	überexpr. Protein
<b>esxAfor_BamHI</b>	cgc <u>GGATCC</u> ATGGCTTTAATTCAATTAACAA CAGAAGAATTGCG	<i>Bam</i> HI	His <sub>6</sub> EsxA, GST-EsxAEsxA
<b>esxArev_Sall</b>	ttccgcgccgctatggccgac <u>GTCGACT</u> TAAATTT GTGATGCAAGATCTTGG	<i>Sall</i>	His <sub>6</sub> EsxA, GST-EsxAEsxA
<b>esxB_BamHI</b>	cgc <u>GGATCC</u> ATGAATTATAAGGAAAGAATT GCTGC	<i>Bam</i> HI	GST-EsxB, His <sub>6</sub> EsxB
<b>esxB_Sall</b>	ttccgcgccgctatggccgac <u>GTCGAC</u> CTAATAAAC CATAGTCAATAGATAATCACG	<i>Sall</i>	GST-EsxB, His <sub>6</sub> EsxB
<b>esxArev_Eco</b>	gGAATT <u>CA</u> ATTTGTGATGCAAGATCTTGG	<i>Eco</i> RI	GST-EsxAEsxA
<b>esxAfor_Eco</b>	g <u>GAATTC</u> ATGGCTTTAATTCAATTAACAACAG	<i>Eco</i> RI	GST-EsxAEsxA

Schnittstellen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen, Überhänge in Kleinbuchstaben dargestellt.

Tabelle 3.8: Oligonukleotide zur Sequenzierung der Inserts in pQE-80L-Kan und pGEX-6P-1

Primer	Sequenz 5'-3'
<b>PM250</b>	GGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACC
<b>PM251</b>	CCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG
<b>pQE seq fwd</b>	TAGGCGTATCACGAGGCCC
<b>pQE seq rev</b>	GTTCTTTACGATGCCATTGGG

Tabelle 3.9: Oligonukleotide zur Konstruktion eines *esxA*-Minigens in *S. oralis* Uo5 mittels Janus-Kassette

Primer	Sequenz 5'-3'
<b>esxA5for</b>	CCTGGTTAAAGCTAGTGGTTCC
<b>esxA3rev</b>	GGTCGCTTGTATCTGTGAGCTAGC
<b>desxA_Janfor</b>	GGCTTTAATTCAATTAACAACAGAAGAATTGCGCGCCTATTCCAGAG GAAATGGATCGG
<b>desxA_esxAuprev</b>	CCGATCCATTTCTCTGGAATAGGCGCGCAATTCTTCTGTTGTTAATT GAATTAAAGCC
<b>desxA_esxAdownfor</b>	CCAAAAGCATAAGGAAAGGGGCCCTAGGAACAAAACGACCAA GATCTTGC
<b>desxA_Janrev</b>	GCAAGATCTTGGTCGTTTTGTTCTAGGGCCCCTTCTTATGCTTTT GG
<b>desxA_for</b>	GGCTTTAATTCAATTAACAACAGAAGAATTGCGCGAACAAAACGAC CAAGATCTTGC
<b>desxA_rev</b>	GCAAGATCTTGGTCGTTTTGTTCTGCGCAATTCTTCTGTTGTTAATT GAATTAAAGCC

Tabelle 3.10: Oligonukleotide zur Deletion von *esxB* in *S. oralis* Uo5 mittels Kanamycin-Kassette

Primer	Sequenz 5'-3'
<b>esxB5for</b>	CACCCAAGTCCTCAATAACCTACG
<b>esxB3rev</b>	CCGTTTGAGAGTCTGCTCC
<b>esxB_aph_upfor</b>	CTTTGATGGAGGTGGTCGTAGATGGCTAAAATGAGAATATCACC
<b>esxB_aph_uprev</b>	GGTGATATTCTCATTTTAGCCATCTACGACCACCTCCATCAAAG
<b>esxB_aph_downfor</b>	CTGGATGAATTGTTTTAGGGGGGAATATGACTACTATCAAG
<b>esxB_aph_downrev</b>	CTTGATAGTAGTCATATTCCCCCTAAACAATTCATCCAG

Tabelle 3.11: Oligonukleotide zur Konstruktion eines *essC*-Minigens in *S. oralis* Uo5

Primer	Sequenz 5'-3'
<b>essCJanusfor</b>	CTACAGCCAAGGTCTGGCCTATTCCAGAGGAAATGGATCG
<b>essCJanusrev</b>	GTTTCCTGATCCTGGTAAACGCTAGGGCCCTTTTCCTTATGC
<b>essCdownfor</b>	GCATAAGGAAAGGGGCCCTAGCGTTTACCAGGATCAGGAAAC
<b>essCdownrev</b>	CTGTAATCAGGTTATCAAACCCATCC
<b>essCupfor</b>	CCTGTGACTTTCCTTTTGCACC
<b>essCuprev</b>	CGATCCATTTCTCTGGAATAGGCCAGACCTTGGCTGTAG
<b>dEssCfor</b>	CAAATCATTTTCTACAGCCAAGGTCTGCGTTTACCAGGATCAGGAAACAACTC
<b>dEssCrev</b>	GAGTTTGTTTCCTGATCCTGGTAAACGCAGACCTTGGCTGTAGAAATGATTTG

Tabelle 3.12: Oligonukleotide zur Herstellung einer Deletion des Terminators von *esxA* in *S. oralis* Uo5

Primer	Sequenz 5'-3'
<b>esxA5for</b>	CCTGGTTAAAGCTAGTGGTTCC
<b>esxA3rev</b>	GGTCGCTTGTATCTGTGAGCTAGC
<b>esxA_ter_Jan_for</b>	GTGGCTTTAGGAGGGCGAGAGCCTATTCCAGAGGAAATGGATCG
<b>esxA_ter_Jan_rev</b>	CGATCCATTTCTCTGGAATAGGCTCTCGCCCTCCTAAAGCCAC
<b>esxA_ter_Jandownfor</b>	CCAAAAGCATAAGGAAAGGGGCCCTAGTATTTTTTATGACGGAG
<b>esxA_ter_Jandownrev</b>	CTCCGTCATAAAAAATACTAGGGCCCCTTTCTTATGCTTTTGG
<b>esxA_ter_for</b>	GTGGCTTTAGGAGGGCGAGATATTTTTTATGACGGAG
<b>esxA_ter_rev</b>	CTCCGTCATAAAAAATATCTCGCCCTCCTAAAGCCAC

Tabelle 3.13: Oligonukleotide zur Überprüfung und Sequenzierung von Veränderungen des ESX-1 Clusters in *S. oralis* Uo5

Primer	Sequenz 5'-3'
His_esxA_seq_for	GAATTTTAACTTGCAATTGAGG
His_esxA_seq_rev	GTTGGGAAAAGATTTTATAGAGTTGATAGC
rpsL_for	GGGACGTGCTGACAAATG
rpsL_rev	ACGCGGTTGATAAGACGAG
con_esxAupfor	GGCGTTGCAAGTGACACGAAGACAGC
esxB_confor	CTCTACACCACTTGCCATGACC
esxB_conrev	CTGCCGCAGCTTTCGCCCACTTACC

Tabelle 3.14: Oligonukleotide zur Durchführung reverser Transkription des ESX-1 Clusters in *S. oralis* Uo5

Primer	Sequenz 5'-3'
esxAfor_BamHI	cgc <u>GGATCC</u> ATGGCTTTAATTCAATTAACAACAGAAGAATTGCG
esxArev_Sall	ttccgcgccgctatggccgac <u>GTCGAC</u> TTAAATTTGTGATGCAAGATCTTGG
esaA_RT_for	GGAAGTAGTCTGCTGGCATTAGG
esaA_RT_rev	GCTTGGCTTGCTTGAAACC
esaB_RT_for	GTGGAGCAACATATCAATATTACCC
esxB_RT_rev	GCTAGAGGAGCTACTTGGAACAGG
esxB_BamHI	cgc <u>GGATCC</u> ATGAATTATAAGGAAAGAATTGCTGC
esxB_Sall	ttccgcgccgctatggccgac <u>GTCGAC</u> CTAATAAACCATAGTCAATAGATAATCACG

Schnittstellen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen, Überhänge in Kleinbuchstaben dargestellt.

Die in Tabelle 3.15 aufgeführten Oligonukleotide wurden zur Herstellung 3'-markierter Dioxigenin (DIG)-Sonden für Northern Blots verwendet. Die DIG-Markierung erfolgte mithilfe des DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerangaben. Die im Kit enthaltene terminale Transferase katalysiert die Übertragung eines Dioxigenin von Didesoxy-UTP (DIG-ddUTP) an das 3'-Ende der Oligonukleotide.

Tabelle 3.15: Oligonukleotide zur Herstellung von Sonden zur Durchführung von Northern Blots

Primer	Sequenz 5'-3'
<b>Sonde_Uo5_esxA</b>	CGGATAGTATTTTGCTCTTGAGTCAATGTACGAAGTACTTGTCT TACTT CCTCAGAACCTTGAGTGTACTTTTGAGCAGAGGTGCGC
<b>Sonde_Uo5_esaA</b>	CGTAGACAGGCTTATCTTCATTTACGATAGCTACATTTAATTTGTCTG CTGAT TAGCCTTTGCATTATTTTCATTGCTAATCG
<b>Sonde_Uo5_esxB</b>	CCAGAAACATCTGTAGAAACACCTGATACACTATCTGTCTG TATCTCCTTCTGTTATGGCAGTTTAAAGTATTCAAAGCAGC

Die in Tabelle 3.17 aufgeführten Oligonukleotide wurden zur Durchführung von quantitativer realtime PCR (qRT PCR) verwendet. Hierfür wurden besondere Kriterien beim Design der Primer angelegt:

Tabelle 3.16: Kriterien Oligonukleotide für qRT PCR

Kriterium	
<b>GC-Gehalt</b>	45-50 %
<b>Schmelztemperatur <math>T_m</math></b>	60-65°C
<b>Primerlänge</b>	20-24 bp (22 bp optimal)
<b>Lage</b>	ca. 50 bp downstream ATG
<b>Produktlänge</b>	145-155 bp

Tabelle 3.17: Oligonukleotide zur Durchführung von quantitativer realtime RT-PCRs des ESX-1 Clusters aus *S. oralis* Uo5

Primer	Sequenz 5'-3'
<b>gyrAf_Uo5</b>	AGGCTTATGAGACTGGTAAAGG
<b>gyrAr_Uo5</b>	CTGAACCAAGCGAACAATATGC
<b>esxAf_Uo5</b>	AACAGAAGAATTGCGCACCTC
<b>esxAr_Uo5</b>	TCTGTGAATTGGCGATCAAAGC
<b>esaAf_Uo5</b>	CCAAGCGACGAGATTTCTTTGAC
<b>esaAr_Uo5</b>	GCCATCATAAGTGACCGAATGAAC
<b>essCf_Uo5</b>	ACAGTAGGGATGTCCATAACC
<b>essCr_Uo5</b>	TCGTTCCAGACGAGTCAATTC
<b>esxBf_Uo5</b>	TCTAACAATTAAGGCCGACTGTGC
<b>esxBr_Uo5</b>	GAATCGTACACCATACCAATCTC

Alle in Tabelle 3.17 aufgeführten Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt bezogen.

### 3.5 Nährmedien

#### 3.5.1 CpH8-Medium

Zur Anzucht und Kultivierung von Streptokokken wurde in dieser Arbeit CpH8-Medium verwendet, wobei es sich um ein Komplexmedium nach Lacks *et al.*, 1960 handelt. Diesem Medium werden zahlreiche Aminosäuren und Vitamine zugesetzt, deren Stoffwechselwege Streptokokken fehlen. Die in Tabelle 3.18 aufgeführten Komponenten wurden steril zusammenpipettiert und dunkel bei 4°C für einige Wochen gelagert.

Tabelle 3.18: Zusammensetzung des CpH8-Mediums

Komponente	Menge [ml]
<b>Pre C</b>	400
<b>Supplement</b>	13
<b>Glutamin (1 mg/ml)</b>	10
<b>Adams III</b>	10
<b>2 % Pyruvat</b>	5
<b>Phosphatpuffer, pH 8</b>	15
<b>5 % Hefeextrakt</b>	9

Tabelle 3.19: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des CpH8-Mediums

Einzelkomponente	Komponente	Menge	Bemerkungen
<b>Pre C</b>	Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g	pH 7,5 einstellen, autoklavieren
	Casaminoacids	5 g	
	L-Tryptophan	5 mg	
	L-Cystein	0,05 g	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l	
<b>Supplement</b>	3 in 1 salts	60 ml	alle Komponenten einzeln autoklavieren, steril zusammenpipettieren
	20 % Glucose	120 ml	
	50 % Saccharose	6 ml	
	Adenosin (2 mg/ml)	120 ml	
	Uridin (2 mg/ml)	120 ml	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l	
<b>Adams III</b>	Adams I	160 ml	sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern
	Adams II	40 ml	
	Asparagin	2 g	
	Cholinchlorid	0,2 g	
	0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1,6 ml	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l	
<b>Phosphatpuffer, pH 8</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	53 ml	autoklavieren
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)	947 ml	

<b>3 in 1 salts</b>	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 mg	
	CaCl <sub>2</sub> , wasserfrei	0,5 mg	
	MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O (0,1 M)	0,2 ml	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l	autoklavieren
<b>Adams I</b>	Biotin	0,15 mg	
	Nicotinsäure	150 mg	
	Pyridoxin-HCl (B6)	175 mg	
	Ca-Panthotenat	600 mg	
	Thiamin-HCl	160 mg	
	Riboflavin	70 mg	sterilfiltrieren und in
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l	dunklen Gefäßen lagern
<b>Adams II</b>	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	500 mg	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg	
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	200 mg	
	HCl konz.	10 ml	sterilfiltrieren und in
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l	dunklen Gefäßen lagern

### 3.5.2 D-Blutagar

Zur Kultivierung von Streptokokken auf Festmedium wurde D-Blutagar verwendet. Der nach Tabelle 3.20 hergestellte Agar wurde nach dem Autoklavieren auf 50°C abgekühlt, mit 3 % defibriniertem Schafsblut (Oxoid GmbH) und gegebenenfalls mit Antibiotika (Tabelle 3.21) versetzt.

Tabelle 3.20: Zusammensetzung von D-Blutagar

Komponente	Menge	Bemerkungen
<b>Glucose</b>	1 g	
<b>Bactopepton</b>	10 g	
<b>Neopepton</b>	5 g	
<b>Hefeextrakt</b>	1,25 g	
<b>NaCl</b>	5 g	
<b>Tris</b>	1,25 g	
<b>Agar</b>	15 g	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub></b>	ad 1 l	autoklavieren

### 3.5.3 LB-Medium und -Agar

Zur Anzucht und Kultivierung von *E. coli* wurde LB (Luria Bertani) - Medium verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Vollmedium, das von der Firma Roth bezogen und nach Herstellerangaben angesetzt wurde. Zur Kultivierung von *E. coli* auf Festmedium wurde LB-Agar verwendet, dem zusätzlich zu den Komponenten des Mediums noch Agar zugesetzt ist. Auch LB-Agar wurde von Roth bezogen. Gegebenenfalls wurde diesem Agar noch Antibiotikum zugesetzt (Tabelle 3.21).

### 3.5.4 Antibiotika

In Tabelle 3.21 sind die Antibiotika aufgeführt, die in dieser Arbeit zur Selektion von Transformanten der angegebenen Organismen verwendet wurden und dazu z.B. LB- oder Blutagar nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C zugesetzt wurden.

Tabelle 3.21: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration [µg/ml]	Lösungsmittel	Organismus
Ampicillin	100	H <sub>2</sub> O	<i>E. coli</i>
Kanamycin	200	H <sub>2</sub> O	<i>S. oralis</i>
Kanamycin	25	H <sub>2</sub> O	<i>E. coli</i>
Streptomycin	200	H <sub>2</sub> O	<i>S. oralis</i>

## 3.6 Wachstum und Konservierung von Bakterienstämmen

### 3.6.1 Wachstum in Flüssigmedium

Das entsprechende Medium wurde entweder mit einer bzw. mehreren Kolonien einer Agarplatte, mit einer Vorkultur oder aus einer Glyzerinkultur (3.6.2) 1:20 bis 1:5 angeimpft.

*E. coli* wurde bei 37°C schüttelnd inkubiert, die Kultivierung von Streptokokken erfolgte bei 37°C ohne Schütteln in einem Wasserbad.



Das Wachstum wurde entweder photometrisch bei einer OD von 600 nm (*E. coli*) bzw. nephelometrisch (Streptokokken) verfolgt (Ultrospec 500, Biochrom Ltd.; Nephelometer Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems LTD). Der Methode der Nephelometrie liegt die Lichtstreuung einer Kultur zugrunde, die abhängig von ihrer Zelldichte ist.

Zur Erstellung von Wachstumskurven von Streptokokken-Stämmen wurden 6 ml vorgewärmtes CpH8-Medium (3.5.1) 2 %ig aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur angeimpft. Das Wachstum wurde alle 30 min nephelometrisch gemessen.

Die Bestimmung der Generationszeit (g) erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase mithilfe folgender Formel:

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0} [\text{min}^{-1}]$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} [\text{min}]$$

$\mu$  = Wachstumsrate [ $\text{min}^{-1}$ ]

X = Zellzahl zum Zeitpunkt t

t-t<sub>0</sub> = Zeitdifferenz [min]

### 3.6.2 Glyzerinkulturen

Um Bakterienstämme dauerhaft zu lagern, wurden Glyzerinkulturen angelegt. Bei einer Zelldichte von N = 70 - 100 wurde der Kultur vorgewärmtes Glyzerin mit einer Endkonzentration von 20 % zugefügt. Nach dem Durchmischen der Kultur wurde diese aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.7 Mikroskopie

Um die Morphologie analysieren zu können, wurden die zu untersuchenden Stämme in einem Phasenkontrastmikroskop (Eclipse E600, Nikon) betrachtet. Dazu wurden 10 µl einer Kultur mit einem Nephelowert von  $N = 40$  auf einen mit Ethanol gereinigten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Die morphologische Analyse erfolgte unter 100facher Vergrößerung. Zur Dokumentation konnten Bilder mittels einer installierten Kamera (CDD-1300B, Nikon) aufgenommen werden.

### 3.8 Transformation von *E. coli*

#### 3.8.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Der Zustand der Kompetenz muss bei *E. coli* künstlich erzeugt werden, da es sich hierbei nicht um ein natürlich kompetentes Bakterium handelt. Dazu wurde in dieser Arbeit die RbCl-Methode verwendet.

200 ml LB-Medium (3.5.3) wurden aus einer Vorkultur einprozentig beimpft und bei 37°C schüttelnd bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 – 0,7 angezogen. Diese Kultur wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und 5 min auf Eis gekühlt. Bei allen nachfolgenden Schritten wurde sichergestellt, dass die Zellen stets gekühlt waren. Die Kultur wurde 5 min bei 8.000 rpm und 4°C im JA-10-Rotor (Zentrifuge Beckman J2-21) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 80 ml kaltem TFB1-Puffer (Tabelle 3.22) resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 8.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 8 ml kaltem TFB2-Puffer (Tabelle 3.22) resuspendiert und in Aliquots zu 100 µl schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.22: Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Puffer	Komponente	Konzentration	Bemerkungen
<b>TFB1</b>	K-Acetat	30 mM	
	RbCl	100 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM	
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM	
	Glyzerin	15 %	pH mit Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren
<b>TFB2</b>	MOPS	10 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM	
	RbCl	10 mM	
	Glyzerin	15 %	pH mit KOH auf 6,5 einstellen, sterilfiltrieren

### 3.8.2 Transformation der chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Methode des Hitzeschocks angewendet. Hierzu wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (3.8.1) auf Eis aufgetaut, mit 0,5 µl Plasmid-DNA bzw. 10 – 20 µl eines Ligationsansatzes (3.16) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte in einem Wasserbad bei 42°C für 90 s. Zur phänotypischen Expression wurde 1 ml LB-Medium (3.5.3) zugegeben und der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, bevor dieser auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert bzw. zum Animpfen einer Flüssigkultur verwendet werden konnte.

### 3.9 Transformation von *S. oralis*

Bei *S. oralis* Uo5 handelt es sich um ein natürlich kompetentes Bakterium, das auch unter Laborbedingungen transformierbar ist (Reichmann *et al.*, 2011).

Bei *S. pneumoniae* kann diese Kompetenz durch Zugabe des kompetenzstimulierenden Peptids (CSP) künstlich erhöht werden (Håvarstein *et al.*, 1995a). Da CSP stammspezifisch ist, wurde in dieser Arbeit CSP von *S. oralis* Uo5 synthetisiert (Aminosäuresequenz DWRISSETIRNLIFPRRK), um die Transformierbarkeit zu erhöhen.

Somit konnte die Transformation von *S. oralis* Uo5 wie folgt durchgeführt werden.

### 3.9.1 Herstellung von *S. oralis* Uo5-Vorkulturen

Zur Herstellung von Vorkulturen zur Transformation von *S. oralis* Uo5 Zellen wurden 6 ml CpH8-Medium mit 0,032 % BSA 5 %ig mit einer exponentiell wachsenden Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer Nephelo von N = 30 - 40 angezogen. Die Zellen wurden entweder direkt in eine Transformation eingesetzt oder als Glycerinkulturen (3.6.2) bei -80°C gelagert. Glycerin-Vorkulturen wurden schonend auf Eis aufgetaut bevor sie in eine Transformation eingesetzt wurden.

### 3.9.2 Transformation von *S. oralis*-Vorkulturen

Zu 180 µl CpH8-Medium mit 0,032 % BSA wurden 20 µl frische oder aufgetaute Vorkultur und 100 ng zu transformierende DNA gegeben. Um die Transformationsrate zu steigern, wurden außerdem 100 ng *S. oralis* Uo5-spezifisches CSP zugesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C zur DNA-Aufnahme und anschließend 90 – 120 min bei 37°C zur phänotypischen Expression inkubiert, bevor dieser unverdünnt bzw. in 0,9 % NaCl verdünnt auf D-Blutagarplatten (3.5.2) mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert wurde. Parallel wurde ein Ansatz ohne DNA als Negativkontrolle durchgeführt. Nach 24 h wurden einzelne Transformanten mit sterilen Zahnstochern auf frische D-Blutagarplatten ohne Antibiotikum (bzw. zur Kontrolle mit Antibiotikum) ausgestrichen. Von den über Nacht bei 37°C inkubierten D-Blutagarplatten wurden Glycerinkulturen (3.6.2) zur Lagerung hergestellt.

## 3.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde hauptsächlich das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Sollte allerdings eine größere Menge Plasmid isoliert werden (z.B. bei Isolierungen von Vektor-DNA), wurde eine Midi-Prep mithilfe des NucleoBond PC 100 Kits (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll für High Copy Plasmide durchgeführt. Die in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> bzw. TE-Puffer (Tabelle 3.23) aufgenommene Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.11 Isolierung von chromosomaler *S. oralis*-DNA

Die Isolierung von chromosomaler *S. oralis*-DNA wurde nach einer Methode von Marmur durchgeführt (Marmur, 1961). Da *S. oralis* nicht durch die Zugabe von SDS lysiert, mussten allerdings noch die lytischen Enzyme Lysozym (Applichem) und Mutanolysin (Sigma Aldrich GmbH) zum Verdau der Zellwand zugegeben werden.

Zellen aus 6 ml einer Kultur mit einer Zelldichte von  $N = 80 - 100$  wurden durch Zentrifugation in einem 15 ml-Greiner-Röhrchen für 8 min bei 8000 rpm (Heraeus Biofuge stratos, Rotor 3046) und 4°C geerntet und nachfolgend entweder sofort für die Isolierung der DNA verwendet oder bei -20°C gelagert.

Das Pellet wurde mit 2 ml eiskaltem 0,9 % NaCl gewaschen und auf 2 ERG aufgeteilt. Diese Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (14.000 g, 5 min) und das Pellet in 180 µl STE-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 90 µl Lysozym (25 mg/ml) und 5 µl Mutanolysin (5.000 U/ml in K-Phosphatpuffer) wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, bis das Eintreten der Lyse zu beobachten war. Zu diesem Zeitpunkt wurden 200 µl 2 % SDS zugegeben und die vollständige Lyse abgewartet. Anschließend wurde der Ansatz mit 100 µl Proteinase K-Lösung (BioRon, 20 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert bevor 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, Roth) zugegeben und der Ansatz bei RT für 30 min geschüttelt wurde. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 g für 3 min wurde die wässrige Oberphase vorsichtig abgenommen und in ein neues ERG überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Verunreinigungen durch die weiße Interphase entstanden. Die abgenommene Oberphase wurde mit 10 µl RNase A-Lösung versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Im Folgenden wurde die Phenolisierung so oft wiederholt (10 – 20 min schütteln), bis die Oberphase klar war. Dann wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopopropanol (100 % p.a.), invertieren und einer Inkubation von 10 min bei RT gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 g wurde das DNA-Pellet mit 800 µl Ethanol (70 % p.a.) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem die DNA getrocknet war, wurde sie in 20 – 100 µl TE-Puffer gelöst und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Zur Kontrolle der isolierten DNA wurde diese auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen (3.14) und die Konzentration mittels Nanodrop-Messung bestimmt (3.13).

Tabelle 3.23: Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. oralis*

Lösung	Komponente	Konzentration	Bemerkungen
TE-Puffer	Tris, pH 8	10 mM	
	EDTA	1 mM	
			autoklavieren
STE-Puffer	TE-Puffer		
	Saccharose	7 %	
			15 min autoklavieren
RNase A-Lösung	RNase A (Roth)	10 mg/ml	in RNase-Puffer lösen, 15 min bei 100°C kochen, bei -20°C lagern
RNase-Puffer	Tris	10 mM	
	NaCl	15 mM	
			pH 7,5 einstellen, autoklavieren
K-Phosphat-Puffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M, 19,2 %	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M, 80,8 %	
			pH 6,2 ergibt sich aus Mischungsverhältnis

### 3.12 Isolierung von RNA aus *S. oralis*

In dieser Arbeit wurde RNA mittels der Hot-Phenol-Methode isoliert (Maes *et al.*, 1992). Bei dieser Methode wird 60°C heißes Phenol zum Aufschluss der Zellen verwendet.

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen, um Verunreinigungen mit RNasen zu vermeiden. Hierbei handelte es sich um das Tragen von Handschuhen, die Benutzung von RNase-freien Filter-Pipettenspitzen (Greiner) und das Reinigen von Oberflächen mit RNaseZAP (Ambion). Außerdem wurden doppelt autoklavierte Gefäße zum Ansetzen und Lagern der Lösungen verwendet.

#### 3.12.1 Kultivierung und Ernte der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in CpH8-Medium. Hierzu wurden 150 ml Medium auf 37°C vorgewärmt und 1:40 mit einer exponentiell wachsenden Kultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert und in 50 ml Aliquots aufgeteilt. Diese Aliquots wurden in 50 ml Greiner-Röhrchen bei 8.000 rpm und RT für 8 min (Heraeus

Biofuge stratos, Rotor 3046) zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt zur Isolierung der RNA eingesetzt.

### 3.12.2 Zellaufschluss und Isolierung der RNA

Das Zellpellet wurde in 4 ml 60°C heißem NAE-gesättigten Phenol/Chloroform (6:1) durch Vortexen resuspendiert, 5 min bei 60°C inkubiert und anschließend mit 4 ml NAES-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde anschließend durch Invertieren gemischt und erneut 5 min bei 60°C inkubiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die aufgeschlossenen Zellen 8 min bei 8.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos, Rotor 3046) und die Oberphase mit der enthaltenen RNA wurde in ein MaxTract High Density Tube (Qiagen) mit 4 ml Phenol/Chloroform (6:1) überführt. Nach mehrmaligem Invertieren wurde für 8 min bei 8.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend konnte die Oberphase, die durch das Gel von der unteren Phenol-Phase getrennt war, durch Dekantieren in ein neues MaxTract High Density Tube überführt und die Phenol-Extraktion wiederholt werden.

Die Fällung erfolgte durch Zugabe der Oberphase in 4 ml vorgelegtes eiskaltes Isopropanol und 400 µl 3 M Natriumacetat (pH 5). Nachdem die Lösung einige Male invertiert worden war, wurde die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Die Gewinnung des RNA-Pellets erfolgte durch Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4°C für 40 min. Das Pellet wurde mit 3 ml 70 % EtOH gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 360 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O (Ambion) gelöst. Die isolierte RNA wurde entweder bei -20°C gelagert oder direkt einem DNase-Verdau unterzogen.

Tabelle 3.24: Lösungen zur Isolierung von RNA aus *S. oralis*

Lösung	Komponente	Konzentration	Bemerkungen
<b>NAE</b>	Na-Acetat, pH 5	50 mM	
	EDTA, pH 8	10 mM	
			autoklavieren
<b>NAE-gesättigtes Phe-nol/Chloroform (6:1)</b>	NAE	10 %	
	Phenol/Chloroform (6:1)	90 %	
			dunkel bei 4°C lagern
<b>NAES</b>	NAE	99 %	
	SDS	1 %	

### 3.12.3 DNaseI-Verdau

Zur Entfernung von Verunreinigungen durch chromosomale DNA wurde diese durch einen Verdau mit DNaseI (NEB) degradiert. Wurde später eine große Menge RNA benötigt (z.B. für RT-PCR oder Northern Blot), wurde die gesamte RNA, sonst (qRT-PCR) nur ein Teil der isolierten RNA eingesetzt.

Für einen Verdau der gesamten RNA wurden 40 µl DNase-Puffer (10x, bei DNaseI mitgeliefert) und 10 µl DNase I (NEB, 2000 U/ml) zu 360 µl RNA-Lösung gegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Für kleinere Mengen RNA, die später für eine qRT-PCR verwendet werden sollten, wurden 48 µl RNA-Lösung mit 34,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 10 µl 10x-Puffer und 7,5 µl DNaseI (2000 U/ml, NEB) wie oben angegeben verdaut.

### 3.12.4 Aufreinigung von RNA

Zur Aufreinigung der RNA nach dem Verdau mit DNaseI wurden verschiedene Methoden angewendet. War die RNA für Northern Blots oder reverse Transkription mit anschließender



RT-PCR bestimmt (große Menge), wurde sie durch Phenolisierung und Ethanolpräzipitation aufgereinigt.

Sollte die RNA allerdings für eine qRT-PCR (3.20) eingesetzt werden, wurde sie mithilfe von Kieselgel-Säulen aufgereinigt (kleine Mengen).

#### 3.12.4.1 Aufreinigung von RNA mit Kieselgel-Säulen

Die DNaseI-verdaute RNA wurde mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Ambion) eluiert. Dieses Kit zeichnet sich dadurch aus, dass die RNA vor der eigentlichen Aufreinigung über eine zusätzliche Säule zur Entfernung chromosomaler DNA gegeben wird.

#### 3.12.4.2 Aufreinigung von RNA durch Phenolisierung und Ethanolpräzipitation

400 µl RNA aus dem DNaseI-Verdau wurden mit 400 µl Aqua-Phenol (Roth) versetzt und 30 s gevortext. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 14.000 g und 4°C wurden 44 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,1) und 900 µl eiskaltes Ethanol (100 %) zur abgenommenen Oberphase gegeben und für 20 min bei -20°C inkubiert, um die RNA zu fällen. Anschließend wurde die gefällte RNA 20 min bei 14.000 g und 4°C pelletiert, mit 200 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 5 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde im Exsikkator getrocknet und in 200 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Ambion) aufgenommen. Zur Kontrolle der isolierten RNA wurde diese auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen (3.14) und die Konzentration mittels Nanodrop-Messung bestimmt (3.13).

### 3.13 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mithilfe des NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies), wozu 1 µl der zu analysierenden Lösung auf die optische Faser des Geräts pipettiert wurde. Je nachdem, welche Art von Nukleinsäure gemessen wur-

de, wurde ein Programm für DNA oder RNA ausgewählt. Das Verhältnis von  $E_{260}/E_{280}$  gibt Auskunft über Verunreinigungen mit Proteinen und Alkohol und sollte 1,8 - 2 betragen,  $E_{260}/E_{230}$  zeigt Verunreinigungen mit Phenol, wenn der Wert >2 ist.

### 3.14 Agarose-Gelelektrophorese

Um Nukleinsäuren aufzutrennen und sichtbar zu machen, wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Aufgrund ihrer negativen Ladung durch Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld und können in einer Gelmatrix, bestehend aus Agarose-Polymeren, nach ihrer Größe aufgetrennt werden, da kleinere Teilchen diese Matrix schneller passieren als größere.

1 % Agarose (LE Agarose, Biozym) wurde in TAE- für DNA- und TBE-Puffer für RNA-Proben aufgekocht, in einen Schlitten der Elektrophorese-Kammer gegossen und ein Kamm für die Bildung der Probestaschen eingesetzt, der nach Erkalten des Gels entfernt wurde. Die Nukleinsäure-Probe wurde mit Ladepuffer (6x DNA Loading Dye bzw. 2x RNA Loading Dye, Fermentas) versetzt und in die Taschen des Gels geladen, als Größenmarker wurde der GeneRuler 1 kb DNA-Ladder bzw. der GeneRuler 100 bp Ladder (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese fand in TAE- bzw. TBE-Puffer bei 130 V für ca. 1-2 Stunden statt.

Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 20 min bei RT inkubiert. EtBr interkaliert mit Nukleinsäuren und fluoresziert bei UV-Bestrahlung, weswegen das Gel auf einem UV-Transilluminator (Oncor M-20, Appligene) angeschaut werden konnte. Zur Dokumentation wurden die Gelbilder gespeichert oder ausgedruckt (Video copy Prozessor P68E, Mitsubishi).

Tabelle 3.25: Puffer zur Durchführung von Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Komponente	Konzentration
<b>TAE-Puffer (50 x)</b>	Tris	2 M
	EDTA, pH 8,0	50 mM
	Essigsäure	1 M
<b>TBE-Puffer (5 x)</b>	Tris	0,5 M
	EDTA	10 mM
	Borsäure	0,5 M

Beide Puffer wurden vor Gebrauch auf 1x bzw. 0,5x verdünnt.

### 3.15 Verdau von DNA

Für die präparative Restriktion von DNA-Fragmenten wurde 1 µg DNA nach Herstellerangaben mit Restriktionsendonukleasen (NEB) für mindestens 1 h bzw. über Nacht bei 37°C verdaut. Bei analytischen Verdaus wurden nur 50 ng DNA eingesetzt.

Sollten die geschnittenen DNA-Fragmente in eine Ligation (3.16) eingesetzt werden, wurden sie über ein Agarose-Gel aufgetrennt (3.14), mit dem Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen. Dabei wurden nur kleine Abschnitte des Agarose-Gels mit EtBr angefärbt und unter UV-Licht ausgeschnitten. Mithilfe dieser Schablone wurde die aufzureinigende DNA-Bande ausgeschnitten.

### 3.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit sticky ends wurde die T4 DNA Ligase (NEB) nach dem Herstellerprotokoll für „cohesive ends“ verwendet, die Inkubation erfolgte bei 16°C über Nacht. Die DNA-Menge betrug 10 – 100 ng, wobei das Insert in dreifachem Überschuss zum Vektor eingesetzt wurde.

### 3.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR ist eine Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten mithilfe gegensätzlich orientierter Oligonukleotide und einer DNA-Polymerase.

In einem ersten Schritt wird doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen denaturiert, weswegen eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet werden muss. Danach wird auf eine niedrigere Temperatur abgekühlt, die abhängig von der Schmelztemperatur der Primer ist und zwischen ca. 55 und 70°C liegt. Bei dieser Temperatur lagern sich die Primer an die beiden Stränge der DNA an (Annealing). Im letzten Schritt findet die Elongation vom 3'-Ende der angelagerten Primer unter Verbrauch von dNTPs statt, wofür das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase gewählt wird. Dieser Zyklus wurde bis zu 34-mal wiederholt, um die gewünschte Menge an DNA zu erhalten.

Sollte die amplifizierte DNA für Klonierungen eingesetzt werden, wurde das iProof™ High-Fidelity PCR Kit (BioRad, mit dNTP Mix (peqlab)) verwendet, da diese Polymerase eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt und somit fehlerhaft eingebaute Nukleotide korrigiert.

Zur Kontrolle von DNA-Fragmenten und zur Amplifikation von DNA zur Sequenzierung wurde der DreamTaq PCR Master Mix (Fermentas) verwendet.

Die Pipettierschemata und die Programme der Thermocycler (TGradient Thermocycler, T1Thermocycler (Biometra)) wurden den Herstellerprotokollen entnommen.

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Firma Seq-IT, Kaiserslautern.

#### 3.17.1 Kultur-PCR

Das Amplifizieren von DNA ohne vorherige Isolation von chromosomaler DNA wurde durch die Methode der Kultur-PCR möglich. Hierzu wurde ein Zellpellet in der halben Menge  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  des ursprünglichen Volumens aufgenommen und 3 µl in eine PCR eingesetzt. Außerdem wurde die initiale Denaturierung auf 10 min verlängert.

Die amplifizierte DNA wurde mithilfe des Jet quick PCR-Purification Kit (Genomed) aufgereinigt.

### 3.17.2 Überlappende PCR

Mithilfe der überlappenden PCR ist es möglich, DNA-Fragmente mit homologen Enden miteinander zu verbinden. Dazu mussten in einem ersten Schritt alle zu verbindenden Einzelfragmente mittels PCR hergestellt werden, sodass homologe Bereiche von mindestens 20 bp entstanden. Anschließend wurden diese aufgereinigt und 2-3 Fragmente als Template in eine überlappende PCR eingesetzt.

Für diese PCR wurde ausschließlich die iProof-Polymerase eingesetzt. Zusätzlich wurde der erste Zyklus ohne Primer durchgeführt, sodass sich die einzelnen Fragmente zusammenlagern und in einem ersten Schritt mit den fehlenden Basen der jeweils anderen Fragmente aufgefüllt werden konnten. Nach diesem Zyklus wurde eine Pause von 30 s programmiert, in der die Primer in den Ansatz gegeben wurden. Die Annealing-Temperatur betrug 55°C.

## 3.18 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription handelt es sich um eine Methode, bei der cDNA mithilfe einer Transkriptase aus RNA synthetisiert wird. In dieser Arbeit wurde cDNA als Template für PCRs (3.17) oder qRT-PCRs (3.20) eingesetzt. Die Synthese von cDNA wurde mit 1 µg RNA und dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Random Primer p(dN)<sub>6</sub> verwendet wurden.

## 3.19 RT-PCR

Diese Methode wurde verwendet, um Transkripte nachzuweisen. Dazu wurde zunächst RNA isoliert (3.12) und anschließend mittels einer PCR mit genspezifischen Primern auf Rückstände von DNA überprüft. War noch DNA in der isolierten RNA vorhanden, wurde der DNase-Verdau (3.12.3) so oft wiederholt, bis die RNA DNA-frei war. Diese RNA wurde nachfolgend in cDNA transkribiert (3.18), die anschließend als Template für PCRs mit genspezifischen Primern eingesetzt wurde.

### 3.20 Quantitative realtime RT-PCR (qRT-PCR)

Mithilfe der qRT-PCR ist die relative Quantifizierung spezifischer RNA möglich. Zunächst wird die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA transkribiert und in einer PCR-Reaktion in Anwesenheit des Fluoreszenz-Farbstoffes SYBR Green amplifiziert, wobei der verwendete Thermocycler am Ende jedes Zyklus die Fluoreszenz misst, die durch die Bindung des Farbstoffes an DNA entsteht. Der Zyklus, bei dem diese Fluoreszenz die Detektionsgrenze erreicht, gibt den Cp-Wert (crossing point) wieder, der bei einem nicht regulierten Kontrollgen (hier *gyrA*) bei verschiedenen Zelldichten gleich sein sollte. Bei Abweichungen kann der Cp-Wert normalisiert werden. Auch für die zu testenden Proben wird der Cp-Wert bestimmt, der dann eine Aussage über die relative Menge an cDNA bzw. RNA einer Probe im Verhältnis zur Referenz liefert. Ist der Cp-Wert der Probe kleiner als der der Referenz, war mehr cDNA im Ansatz vorhanden und umgekehrt. Der Faktor des DNA-Mengenunterschiedes (Ratio) der Proben zur Referenz wird durch die Differenz der Cp-Werte berechnet, der zur Basis von 2 logarithmiert wird, da die Menge an DNA in jedem Zyklus verdoppelt wird.

Die für die qRT-PCR benötigte RNA wurde nach Kapitel 3.12 isoliert und nach Kapitel 3.12.4.1 aufgereinigt. Nachdem die Konzentration mittels Nanodrop (3.13) bestimmt und auf 200 ng/μl eingestellt worden war, wurde die Qualität mithilfe eines Agarosegels kontrolliert. Außerdem wurde die RNA mit den später verwendeten Primern (Tabelle 3.17) auf Rückstände von DNA untersucht und gegebenenfalls solange mit DNaseI verdaut (3.12.3), bis die RNA keine DNA mehr enthielt. Um für alle Gene möglichst gleiche Bedingungen herzustellen, mussten die Primer besondere Kriterien erfüllen, die in Tabelle 3.16 aufgeführt sind. Außerdem wurden die Primer in DNase freiem H<sub>2</sub>O (DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O, Ambion) gelöst.

1 μg RNA wurde anschließend in cDNA revers transkribiert (3.18), wovon 5 μl einer 1:100-Verdünnung als Template eingesetzt wurden. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung einer Reaktion.

Tabelle 3.26: Zusammensetzung einer qRT-PCR-Reaktion

Komponente	Volumen
Template cDNA 1:100	5 µl
SYBR Premix ExX Taq (Perfect Real Time, TaKaRa)	10 µl
Forward Primer 10 pmol/µl	0,4 µl
Reverse Primer 10 pmol/µl	0,4 µl
DEPC H <sub>2</sub> O (Ambion)	4,2 µl

Alle Ansätze wurden in 20 µl LightCycler Kapillaren (Roche) pipettiert und 15 s bei 3.000 rpm in einer LC Carousel 2.0 Zentrifuge (Roche) zentrifugiert. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte in einem LightCycler 2.0 Thermocycler (Roche). Zunächst fand eine initiale Denaturierung von 20 s bei 95°C statt. Anschließend wurden 40 Zyklen mit einer Denaturierung von 5 s bei 95°C und einem Annealing- und Elongationsschritt von 20 s bei 60°C durchgeführt, wobei die Änderung der Temperatur 20°C/s betrug. Um zu überprüfen, ob es sich bei den entstandenen Produkten um spezifische Produkte handelt, wurde im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wobei die Temperatur um 0,1°C/s von 65°C auf 95°C erhöht und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler Software 4.0 (Roche). Alle Experimente wurden einmal sowohl mit der gleichen als auch mit einer unabhängig isolierten RNA wiederholt.

### 3.21 Northern Blot

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren, bei dem der Nachweis spezifischer RNA möglich wird. Hierzu wird zunächst die Gesamt-RNA isoliert, über ein Agarose- bzw. PAA-Gel mit Harnstoff aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert und durch Crosslink kovalent an diese gebunden. Der Nachweis der spezifischen RNA erfolgt dann über genspezifische Dioxigenin-markierte Sonden und eine anschließende Farbreaktion.

### 3.21.1 Auftrennung der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode eignet sich vor allem zur Detektion größerer RNA-Fragmente. 10 µg RNA (3.12) wurden wie in Kapitel 3.14 beschrieben über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt, wobei TBE-Puffer als Laufpuffer und zur Herstellung des Gels verwendet wurde. Als Marker wurde ein Standard von 1 – 4 kb verwendet (P. Marx, unveröffentlicht), als Probenpuffer diente 2x RNA Loading Dye (Fermentas).

### 3.21.2 Auftrennung der RNA mittels denaturierender Polyacrylamid-Elektrophorese

Handelt es sich um kleinere RNA-Fragmente mit einer Größe von wenigen hundert Nukleotiden, wird eine Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden zunächst zwei Glasplatten (eine Ohrenplatte und eine Platte ohne Ohren, Eigenbau) mit Ethanol und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gereinigt, mittels eines Spacers auf jeder Seite separiert und über zwei Klammern auf jeder Seite befestigt. Die Abdichtung am unteren Ende erfolgte durch 2 % Agarose, die in einen Sockel gegossen worden war und in den auch die Glasplatten gestellt wurden. Nach Polymerisation der Agarose wurde das denaturierende PAA-Harnstoff-Gel (s.u.) zwischen die Glasplatten gegossen und am oberen Ende ein Kamm eingesetzt, der die Probenaschen formte. Nach abgeschlossener Polymerisation des Gels wurden die Platten aus dem Sockel entnommen und in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt (Modell Eigenbau „Berlin“), deren Kammern mit 1x TBE-Puffer (Tabelle 3.25) gefüllt wurden. Mit einer Spritze wurden die Taschen von ausgefallenem Harnstoff befreit. Anschließend wurde ein Vorlauf von 30 min bei 200 V gestartet, um eine bessere Auftrennung der Proben zu erreichen. 3 µg RNA wurden mit 2x RNA Loading Dye (Fermentas) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und zusammen mit dem Marker (70 – 200 nt, Marx, 2008) in die Taschen des Gels aufgetragen. Der Lauf des Gels wurde bei 200 V durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt, kurz mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Transilluminator kontrolliert (3.14).



Tabelle 3.27: Zusammensetzung eines PAA-Harnstoff-Gels zur Auftrennung von RNA

Komponente	Menge
Acrylamid (19:1) (Roth)	6 ml
8 M Harnstoff in 1 x TBE	24 ml
10 % APS	200 µl
TEMED (Sigma)	15 µl

### 3.21.3 Blotting der RNA

Um die aufgetrennte RNA vom Gel auf eine Nylon-Membran zu übertragen, wurde die Methode des Elektroblootings verwendet. Dazu wurden die positiv geladene Nylon-Membran (Roche) und zwei Whatmanpapiere auf die Größe des Gels zugeschnitten und in 0,5 x TBE-Puffer (Tabelle 3.25) getränkt. Anschließend wurden Gel und Membran zwischen die beiden Whatmanpapiere gelegt und das Sandwich zwischen den beiden Pole der Blotapparatur platziert, wobei sich das Gel auf der Anoden- und die Membran auf der Kathodenseite befand. Das Blotting fand für 30 min bei 400 mA statt.

### 3.21.4 UV-Crosslinking

Zur kovalenten Bindung der RNA an die Nylon-Membran wurde die Membran 1 min mit einer UV-Strahlung von 0,12 J/cm<sup>2</sup> in einem UV-Crosslinker (BLX254, MWG Biotech) bestrahlt.

### 3.21.5 Detektion spezifischer RNA

Die Membran mit der kovalent gebundenen RNA wurde zunächst mit 20 ml Prähybridisierungspuffer in einem Hybridisierungsröhrchen (Schott) 30 min bei 50°C drehend inkubiert. Nach der Prähybridisierung folgte die Hybridisierung mit den DIG-gelabelten spezifischen Sonden, die sich in Hybridisierungspuffer befanden (Tabelle 3.15), über Nacht bei 50°C dre-

hend im Hybridisierungssofen. Zur Hybridisierung des Markers wurden die zugehörigen Sonden verwendet (70 – 200 nt: Marx, 2008; 1-4 kb: P. Marx, unveröffentlicht).

Die folgenden Schritte fanden schwenkend bei RT und unter Verwendung des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche) statt. Die Membran wurde 2-mal 15 min mit Waschlösung 1 und 2-mal 15 min mit Waschlösung 2 gewaschen, bevor sie 1 min in Washing Buffer äquilibriert wurde. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran anschließend 30 min mit Blocking Buffer inkubiert, bevor sie 30 min mit Anti-Dioxigenin-AP Fab fragments-Antikörpern (1:5.000 in Blocking Buffer, Roche) dekoriert wurde, die an alkalische Phosphatase gekoppelt sind. Anschließend wurde die Membran erneut 2-mal 15 min mit Washing Buffer gewaschen und 2 min in Detektionspuffer äquilibriert. Abschließend wurde der Blot mit 60 µl NBT/BCIP-Stammlösung (Roche) / 10 ml Detektionspuffer gefärbt. Nach ca. 5 – 15 min waren dunkle Banden sichtbar, die durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit NBT/BCIP entstanden. Die Reaktion wurde durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt und die Membran zwischen zwei Whatmanpapieren getrocknet, bevor sie durch Einscannen dokumentiert werden konnte.

Tabelle 3.28: Lösungen zur Durchführung von Northern Blot

Lösung	Komponente	Konzentration	Bemerkungen
20x SSC	NaCl	3 M	
	Na <sub>3</sub> Citrat	0,3 M	
			pH 7 einstellen, autoklavieren
Prähybridisierungspuffer	SDS	5 %	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mM	
	Blocking Reagent*	2 %	
Hybridisierungspuffer	wie Prähybr.puffer		
	DIG-gelabelte Sonden	100 µM	
Waschlösung 1	SSC	2x	
	SDS	0,1 %	
Waschlösung 2	SSC	0,5x	
	SDS	0,1 %	
Washing Buffer	Washing Buffer 10x*	1x	

<b>Blocking Buffer</b>	Maleic acid Buffer 10x*	1x
	Blocking Solution 10x*	1x
<b>Detektionspuffer</b>	Detection Buffer 10x*	1x

\* aus DIG Wash and Block Buffer Set (Roche)

### 3.22 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Um Proteine aus dem Zellüberstand zu isolieren, wurde zunächst eine *S. oralis*-Kultur in CpH8-Medium (3.5.1) bis zu einer Nephelo von 70 angezogen und die Zellen vom Überstand durch Zentrifugation bei 11.000 g und 4°C abgetrennt.

1 ml kalter Kulturüberstand bzw. Proteinlösung wurde durch Vortexen mit  $\frac{1}{4}$  Volumen eiskalter 50 % TCA und  $\frac{1}{5}$  Volumen eiskaltem 1 % Deoxycholat gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 14.000 g und 4°C wurde der Überstand entfernt und der entstandene weiße Niederschlag in 1 ml eiskaltem Aceton durch Vortexen resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 14.000 g und 4°C wurde das Aceton abgenommen, das Pellet getrocknet und in 30 µl 2x Lämmli Probenpuffer (Tabelle 3.30) gelöst. Bevor die gefällten Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden, wurden sie 5 min bei 95°C gekocht.

### 3.23 Herstellung von *S. oralis*-Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde zunächst eine Kultur in CpH8-Medium (3.5.1) bis zu einem Nephelowert von 70 angezogen und die Zellen durch Zentrifugation bei 11.000 g und 4°C geerntet. Das so entstandene Zellpellet wurde in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) resuspendiert, dem 0,2 % Triton X100, 0,8 mg/ml Lysozym (AppliChem) und 0,5 mg/ml Mutanolysin (Sigma Aldrich) zugesetzt worden waren. Bei Triton X100 handelt es sich um ein Detergenz, Lysozym und Mutanolysin wirken als Muraminidasen, die die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin spalten.

Um eine definierte Menge lysierter Zellen aufzutragen, wurde das Resuspensionsvolumen so berechnet, dass 5  $\mu$ l der Lysatprobe, die auf ein Gel aufgetragen wurden, 1 ml einer Kultur mit einer Zelldichte von  $N = 20$  entsprechen.

Die resuspendierten Zellen wurden bei 37°C so lange inkubiert, bis diese vollständig lysiert waren, was mit einer Klärung der Zellsuspension einher ging und bis zu mehrere Stunden dauerte. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Pro Spur eines SDS-Gels (3.24) wurden standardmäßig 5  $\mu$ l eingesetzt, was 1 ml einer Kultur mit  $N = 20$  entspricht.

### 3.24 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes. SDS lagert sich irreversibel an Proteine und zerstört ihre Sekundärstruktur durch seine denaturierende Wirkung. Disulfidbrücken werden durch das im Lämmli-Probenpuffer (Tabelle 3.30) enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. Da SDS die Ladungen der Aminosäuren durch seine negative Ladung überdeckt, ist die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht möglich.

Durch das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid lassen sich in einem SDS-PAA-Gel verschieden große Poren generieren, durch die Proteine je nach Molekulargewicht bei Anlegen einer Spannung unterschiedlich schnell laufen. Diese Poren entstehen durch eine Quervernetzung von monomerem Acrylamid mittels Bisacrylamid, das durch den Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) aktiviert wird. TEMED wirkt bei dieser Reaktion als Katalysator. Trenn- und Sammelgel enthielten verschiedene Tris-Puffer, wodurch sich die Proteine zunächst zu einer scharfen Bande sammelten, bevor die Auftrennung im Trenngel erfolgte. In dieser Arbeit wurden 5 %ige Sammel- und 15 %-ige Trenngele verwendet.

Tabelle 3.29: Zusammensetzung von SDS-PAA-Gelelen zur Auftrennung von Proteinen

Komponente	Menge 5 % Sammelgel	Menge 15 % Trenngel
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	8,55 ml	3,45 ml
Rotiphorese Gel 30*	2,55 ml	7,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	3,75 ml
0,5 M Tris pH 6,8	3,75 ml	-
10 % SDS	150 µl	150 µl
10 % APS**	75 µl	75 µl
TEMED***	7,5 µl	7,5 µl

\* 37,5 % Acrylamid / 1 % Bisacrylamid, Roth

\*\* Ammoniumpersulfat

\*\*\* Sigma

Die Herstellung der SDS-PAA-Gele erfolgte analog zur Herstellung der PAA-Harnstoff-Gele zur Auftrennung von RNA (3.21.2). Die Glasplatten wurden gereinigt, zusammengebaut und in einen Sockel mit flüssiger Agarose zum Abdichten des unteren Endes gestellt. Nach Erkalten der Agarose wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das H<sub>2</sub>O abgeschüttet und Reste mit Whatmanpapier aufgenommen. Nach Gießen des Sammelgels auf das Trenngel wurde ein Kamm eingesetzt, der die späteren Probestaschen formte.

Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde das Gel aus dem Sockel entnommen und in eine Elektrophorese-Kammer (Eigenbau „Berlin“) eingespannt, die mit 1 x Lämmli Laufpuffer gefüllt wurde.

Die Proben wurden mit Lämmli Probenpuffer versetzt, 2 min bei 95°C denaturiert und kurz abzentrifugiert, bevor sie mit einer Spritze in die Taschen des Gels pipettiert wurden. Als Standards kamen peqGold II für Coomassie-Gele und peqGold IV (peqlab) für Western Blots zum Einsatz. Die Elektrophorese wurde bei 35 mA durchgeführt bis die Lauffront am unteren Ende des Gels sichtbar war.

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele entweder für einen Western Blot (3.30) eingesetzt oder mit Coomassie angefärbt. Hierzu wurden sie in einer Plastikschiene mit Coomassie-Färbelösung für ca. 1 h schwenkend bei RT inkubiert. Zum Entfärben der Gele wurden diese ca. 1 h in Entfärber 1 und anschließend in Entfärber 2 schwenkend inkubiert.

bis der Hintergrund vollständig entfärbt war. Zur Dokumentation wurden die entfärbten Gele mit einem handelsüblichen Scanner gescannt.

Tabelle 3.30: Zur Durchführung einer SDS-PAGE verwendete Lösungen

Lösung	Komponente	Menge
<b>2 x Lämmli Probenpuffer</b>	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1,875 ml
	0,5 M Tris pH 6,8	1,875 ml
	50 % Glycerin	3 ml
	SDS	0,3 g
	Bromphenolblau	0,2 mg
	2-Mercaptoethanol	750 µl
<b>5 x Lämmli Laufpuffer *</b>	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 2 l
<b>Coomassie-Färbelösung**</b>	Coomassie R-250	2 g
	Coomassie G-250	50 mg
	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
<b>Entfärber 1</b>	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
<b>Entfärber 2</b>	Methanol	100 ml
	Essigsäure	50 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

\* 1 x verwenden

\*\* über Nacht in geschlossenem Gefäß rühren, filtrieren

### 3.25 Überexpression von Proteinen mithilfe eines GST- bzw. His<sub>6</sub>-tags

Die Proteine EsxA und EsxB aus *S. oralis* Uo5 wurden als N-terminale Fusion mit einem His-tag überproduziert. Zur späteren Antikörper-Produktion wurden die beiden Proteine als N-terminale GST-Fusion hergestellt, wobei die Sequenz von EsxA verdoppelt wurde, um das größere Protein GST-EsxA-EsxA zu erhalten. Der GST-tag wurde vor Verwendung als Antigen abgespalten (3.28).

Die Fusion mit dem His<sub>6</sub>-tag fand mittels Klonierung in den Vektor pQE-80L-Kan (Tabelle 3.6) statt. Dazu wurde *esxA* zunächst mit den Primern *esxAfor\_BamHI* und *esxArev\_Sall* bzw. *esxB* mit den Primern *esxBfor\_BamHI* und *esxBrev\_Sall* (Tabelle 3.7) mittels der iProof-Polymerase amplifiziert (3.17). Die Fusionierung der Proteine an einen GST-tag wurde mit dem Vektor pGEX-6P-1 (Tabelle 3.6) erreicht. *EsxB* wurde zu diesem Zweck ebenfalls mit *esxBfor\_BamHI* und *esxBrev\_Sall* amplifiziert, *esxA* dagegen mit *esxAfor\_BamHI* und *esxArev\_Eco* bzw. mit *esxAfor\_Eco* und *esxArev\_Sall*, um die Verdoppelung des Gens zu erreichen. Die Primer wurden so konstruiert, dass jeweils das vollständige Gen mit Start- und Stoppcodon an das 3'-Ende des tags fusioniert werden konnte.

Sowohl die Plasmide als auch die PCR-Amplifikate wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (3.15) und anschließend miteinander ligiert (3.16). Die Selektion der Plasmide erfolgte in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Nach Überprüfung der Sequenz wurden die Plasmide in den Überexpressionsstamm *E. coli* JM109 transformiert.

Zur Überexpression wurden die Stämme mit dem entsprechenden Plasmid über Nacht in einem Volumen von 100 ml LB-Medium (3.5.3) mit entsprechendem Antibiotikum (25  $\mu$ g/ml Kanamycin für pQE-80L-Kan- und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin für pGEX-6P-1-Derivate) schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 1 – 2 l LB-Medium mit Selektionsantibiotikum mit diesen Vorkulturen so beimpft, dass die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,3 nicht überschritt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 1 wurden der Kultur 500  $\mu$ l entnommen, bei 14.000 g abzentrifugiert, das Zellpellet in 50  $\mu$ l 2x Lämmli Probenpuffer (Tabelle 3.30) resuspendiert und 5 min bei 95°C zur Denaturierung gekocht (= Probe „vor Induktion“). Die Expression des gewünschten Proteins wurde zu diesem Zeitpunkt mit 1 mM IPTG induziert. Die His<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden über Nacht bei 20°C induziert, GST-EsxA-EsxA 4 h bei 15 °C und GST-EsxB 4 h bei 18°C. Diese Bedingungen wurden gewählt, weil Vorversuche mit anderen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen zu einer geringeren Ausbeute führten. Nach der Induk-

tion wurde erneut eine Probe wie oben beschrieben entnommen. Die Zellen wurden anschließend bei 12.000 g und 4°C vom Medium getrennt und in 35 ml Lysepuffer (His<sub>6</sub>-Proteine) bzw. PBSKMT (GST-Proteine) resuspendiert.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschall, wozu die Zellsuspension 6-mal 1 min mit Pausen von 1 min auf Eis beschallt wurde (Branson sonifier B-12, Stufe 10). Das Zelllysats mit gelösten Proteinen wurde vom Rest der Zellen mittels Zentrifugation bei 35.000 g und 4°C für 40 min getrennt. Das bei dieser Zentrifugation entstandene Pellet wurde erneut in 35 ml Lysepuffer bzw. PBSKMT resuspendiert. Von Zelllysats und Pellet wurden 10 µl entnommen, mit 10 µl 2 x Lämmli-Probenpuffer gemischt und bei 95°C 5 min denaturiert. Bei Bedarf wurden Zelllysats und Pellet bei -80°C gelagert.

Zum Test der Bindung des überexprimierten Proteins an das jeweilige Säulenmaterial wurde eine sog. Kurzbindung durchgeführt. Für His<sub>6</sub>-Proteine wurde Ni<sup>2+</sup>- Agarose (Qiagen), für GST-Proteine GSH-Sepharose (Glutathione Sepharose High Performance, GE Healthcare) verwendet. 60 µl Säulenmaterial wurden 2-mal mit 1 ml Lysepuffer bzw. PBSKMT gewaschen (Zentrifugation bei 3.000 g) und anschließend mit 100 µl Zelllysats 1 h bei 4°C gerollt. Um ungebundenes Protein zu entfernen, wurde das Säulenmaterial erneut 2-mal mit entsprechendem Puffer gewaschen und schließlich in 50 µl 2 x Lämmli Probenpuffer resuspendiert. Die Probe wurde ebenfalls bei 95°C 5 min denaturiert und mit den vorher abgenommen Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen (3.24), wobei die Mengen angepasst wurden.

Die Aufreinigung der im Zelllysats gelösten Proteine erfolgte mit 2,5 ml resuspendiertem Säulenmaterial, das wie oben beschrieben 2-mal mit 35 ml des jeweiligen Puffers gewaschen worden war, bevor es zusammen mit dem Zelllysats 1 h bei 4°C rollend inkubiert wurde. Anschließend wurde das Säulenmaterial-Lysatsgemisch auf eine Leersäule (Econo-Pac Disposable Chromatography Columns, Biorad) gegeben. Vom Durchfluss wurde eine Probe von 10 µl genommen und wie oben beschrieben behandelt. Das in der Leersäule verbliebene Säulenmaterial mit dem gebundenen Protein wurde 2-mal mit 40 ml Waschpuffer (Tabelle 3.31) bzw. mit 40 ml PBSKMT und 40 ml PBSKM gewaschen. Bei His<sub>6</sub>-Proteinen war es möglich, die Konzentration von Imidazol im Waschpuffer zu erhöhen, falls das aufgereinigte Protein Verunreinigungen enthielt. Diese Vorgehensweise wurde bei der Aufreinigung von His<sub>6</sub>EsxB angewendet, wo die Imidazolkonzentration des Waschpuffers auf 50 mM erhöht wurde. Die Elution der aufgereinigten Proteine fand in 6 – 8 Fraktionen zu 1 ml mit dem jeweiligen Elutionspuffer statt. Von jeder Fraktion wurden 10 µl Probe für ein SDS-Kontrollgel



abgenommen und wie oben beschrieben behandelt. Die Proteinkonzentration wurde laut Kapitel 3.27 bestimmt. Die Lagerung der aufgereinigten Proteine erfolgte bei -80°C. His<sub>6</sub>-Proteine, die sich noch im Elutionspuffer befanden, konnten nicht bei -80°C gelagert werden, da diese ausfallen wenn sie in Anwesenheit von Imidazol eingefroren werden. In diesem Fall wurden die Proteine bei 4°C gelagert, bis die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt umgepuffert wurden (3.26).

Tabelle 3.31: Lösungen zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>- bzw. GST-Fusionsproteinen

Lösung	Komponente	Konzentration	Bemerkungen
<b>Lysepuffer</b>	Tris	50 mM	
	NaCl	200 mM	
	β-Mercaptoethanol	2 mM	
	Imidazol	10 mM	
			pH 8,0
<b>Waschpuffer</b>	Tris	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	β-Mercaptoethanol	2 mM	
	Imidazol	20 mM (50 mM)	
			pH 8,0
<b>His<sub>6</sub>Elutionspuffer</b>	Tris	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	β-Mercaptoethanol	2 mM	
	Imidazol	250 mM	
			pH 8,0
<b>PBSKM</b>	20 x PBS, Tabelle 3.33	1 x	
	KCl	3 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	
			pH 7,3
<b>PBSKMT</b>	20 x PBS, Tabelle 3.33	1 x	
	KCl	3 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	

	Tween 20	0,1 %	
			pH 7,3
<b>GSH-Elutionspuffer</b>	Tris	50 mM	
	GSH	10 mM	
			frisch herstellen

### 3.26 Umpufferung von Proteinen

Die Umpufferung von Proteinen erfolgte mit PD-10 Säulen (GE Healthcare) nach Herstellerangaben, wobei das Auftragsvolumen 2,5 ml betrug. Dazu wurden je nach Probenvolumen Fraktionen des aufgereinigten Proteins vereinigt. Die Proteine wurden in Fraktionen zu 0,5 ml eluiert. Für kleinere Volumina wurden illustra NAP-5-Säulen (GE Healthcare) eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.27 Quantifizierung von Proteinen

#### 3.27.1 Quantifizierung von Proteinen mittels Nanodrop

Die Quantifizierung von Proteinlösungen wurde mithilfe des Nanodrops (3.13) photometrisch bestimmt, wozu ein spezielles Programm für Proteine gewählt wurde, und mit dem proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten multipliziert. Ansonsten wurde verfahren wie oben für Nukleinsäuren beschrieben.

#### 3.27.2 Quantifizierung von Proteinen mittels Bradford-Assay

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde neben der oben beschriebenen Methode außerdem der Assay nach Bradford angewendet (Bradford, 1976). Dazu wurden 790 µl des Puffers, in dem das Protein gelöst war, mit 200 µl Roti®-Quant (Roth) und 10 µl Proteinlösung 15 min bei RT inkubiert und anschließend die OD<sub>595</sub> bestimmt. Als Referenz

diente ein Ansatz, in dem kein Protein enthalten war. Bei der Färbelösung handelt es sich um eine Coomassie Brilliant Blue-G250-Färbelösung, deren Absorptionsmaximum bei Proteinbindung von 470 nm auf 595 nm verschoben wird. Über eine vorher angefertigte Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) konnte der Proteingehalt der Lösung ermittelt werden, wobei Messungen außerhalb des Messbereichs der Eichgerade mit entsprechender Verdünnung der Proteinlösung wiederholt wurden.

### 3.28 Abspaltung des GST-tags mithilfe der PreScission Protease

Zur Verwendung der GST-Fusionsproteine als Antigen musste der GST-tag abgespalten werden, da dieser immunogen ist und verhindert werden sollte, dass Antikörper gegen GST gebildet werden. Die Abspaltung erfolgte während das Protein mit dem GST-tag an das Säulenmaterial gebunden war. Dazu wurde das Säulenmaterial in der Leersäule mit 20 ml PBSKM und 20 ml Cleavage Buffer (Tabelle 3.32) gewaschen und anschließend in 1 ml Cleavage Buffer resuspendiert. Die Abspaltung des tags fand mithilfe von 40 µl PreScission Protease (GE Healthcare) über Nacht bei 4°C statt, wozu die Säule mit Parafilm verschlossen wurde. Die PreScission Protease spaltet an einer spezifischen Aminosäuresequenz zwischen dem GST-tag und dem fusionierten Protein. Am nächsten Tag wurde die Säule geöffnet und die Proteinlösung aufgefangen. Eine zweite Elution fand mit 0,5 ml Cleavage Buffer statt.

Tabelle 3.32: Zusammensetzung Cleavage Buffer

Komponente	Konzentration
Tris/HCl, pH 7	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Dithiothreitol	1 mM

### 3.29 Herstellung von Antiseren gegen EsxA und EsxB

Zur spezifischen Detektion von EsxA und EsxB wurden zunächst Antiseren gegen diese beiden Proteine hergestellt. Dazu wurden EsxA und EsxB als N-terminales GST-Fusionsprotein in *E. coli* überproduziert (3.25), wobei die Sequenz von EsxA verdoppelt wurde (GSTEsxA-EsxA), um die Antikörperproduktion durch die Vergrößerung des Proteins zu steigern. Die überproduzierten Proteine wurden aufgereinigt und der GST-tag mittels PreScission Protease abgespalten (3.28). Die Herstellung der Antiseren erfolgte durch die Firma Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien) nach dem 28-day Speedy Protokoll, das 4 Injektionen und 3 Blutungen beinhaltet. Für jedes Antigen wurden zwei Kaninchen nach diesem Protokoll immunisiert. Die Injektionen fanden an Tag 0, 7, 10 und 18 statt, die Blutentnahmen an Tag 0 (= Prä-Immun-Serum), an Tag 21 (= Medium-Bleed) und an Tag 28 (= Final-Bleed). Ein Kaninchen, das mit EsxB immunisiert wurde, verstarb während der Immunisierung, weswegen nur die Antiseren gegen EsxB eines Kaninchens geliefert wurden. Es standen also folgende Antiseren zur Verfügung: Pre-Immun-Seren gegen EsxA-EsxA ( $\alpha$ EsxA P1 und  $\alpha$ EsxA P2; P: Pre-Immun-Serum, Zahl: Kaninchen 1 bzw. 2), Seren der Zwischenblutung gegen EsxA-EsxA ( $\alpha$ EsxA M1 und M2), Seren der Endblutung gegen EsxA-EsxA ( $\alpha$ EsxA F1 und F2), sowie die korrespondierenden Seren gegen EsxB ( $\alpha$ EsxB P,  $\alpha$ EsxB M und  $\alpha$ EsxB F).

#### 3.29.1 Überprüfung der Antiseren gegen EsxA und EsxB

Die Spezifität der erhaltenen Antiseren gegen EsxA wurde überprüft, indem sie gegen das Antigen und BSA als Kontrollprotein in einer Western Blot Analyse verwendet wurden. Die Seren beider Blutungen der Kaninchen ( $\alpha$ EsxA M1, M2, F1 und F2) erkannten ihr Antigen. Da die Antiseren allerdings für den Nachweis der Proteine im Zelllysate bzw. im Zellüberstand eingesetzt werden sollten, wurden die verschiedenen Seren gegen Zelllysate und TCA-gefällte Überstände des Wildtyps und der Deletionsderivate von *esxA* und *esxB* getestet. Aus diesen Tests ergab sich, dass für weitere Arbeiten die Antiseren  $\alpha$ EsxA F2 und  $\alpha$ EsxB M in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet wurden (Abbildung 4.6). Beim Test der Antiseren  $\alpha$ EsxA M1 und F1 stellte sich heraus, dass hier keine spezifischen Antikörper gebildet worden

waren, da sich das Signalmuster des Deletionsstammes und des Wildtyps nicht unterschieden.

Die Bestimmung des Antigentiters ergab, dass  $\alpha$ EsxA F2 1 ng Antigen erkennt,  $\alpha$ ESXB M erkennt das Antigen bis mindestens 10 ng (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8).

### 3.30 Western Blot

Mithilfe eines Western Blots können Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dazu werden Proteinproben zunächst mittels SDS-PAGE (3.24) aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern und z.B. einer Farbreaktion detektiert.

Das Übertragen der Proteine aus einem SDS-Gel fand in dieser Arbeit mittels Elektroblootting statt. Dazu wurde das SDS-Gel zusammen mit einer PVDF-Membran (0,2  $\mu$ M Porengröße, peqlab), die mit Methanol aktiviert und in Blotpuffer getränkt worden war, luftblasenfrei zwischen zwei Whatmanpiere (ebenfalls in Blotpuffer getränkt) und in die mit Blotpuffer gefüllte Blot-Apparatur (Trans-Blot Cell, BioRad) geschoben. Dabei befand sich das Gel auf der Anoden-, die Membran auf der Kathodenseite. Als Marker wurde peqGold IV verwendet, dessen Banden vorgefärbt sind. Das Blotting fand für 1 h bei 500 mA statt, wobei der Blotpuffer durch eine Kühlspirale auf 15°C gekühlt wurde.

Anschließend wurde die Membran für 30 min in PBST schwenkend bei RT inkubiert, um freie Bindestellen zu blocken. Die Inkubation mit dem proteinspezifischen Antikörper bzw. Antiserum fand über Nacht schwenkend bei 4°C statt. Um Reste des Antikörpers auszuwaschen, wurde die Membran mit 1 x PBS, 2-mal mit PBST und nochmals mit 1 x PBS gewaschen, bevor sie 1 h bei RT schwenkend mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, SIGMA, 1:30.000 in PBST) inkubiert wurde. Die Membran wurde erneut wie oben beschrieben gewaschen, bevor sie in vorgewärmtem Blotsubstratpuffer äquilibriert wurde (37°C). Die Detektion fand analog zum Northern Blot mit 60  $\mu$ l NBT/BCIP Stammlösung (Roche) pro 10 ml vorgewärmtem Blotsubstratpuffer statt. Die Farbreaktion des Substrats mit der alkalischen Phosphatase wurde nach ausreichender Färbung mit H<sub>2</sub>O gestoppt und die Membran nach Trocknung zur Dokumentation eingescannt.

Tabelle 3.33: Lösungen zur Durchführung eines Western Blots

Lösung	Komponente	Konzentration	Bemerkungen
<b>Blotpuffer</b>	Glycin	100 mM	
	Tris	200 mM	
<b>20 x PBS</b>	NaCl	2,7 M	1 x verwenden
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	160 mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM	
<b>PBST</b>	PBS	1 x	
	Tween 20	0,05 %	
<b>Blotsubstratpuffer</b>	Tris	100 mM	
	NaCl	100 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM	
			pH 9,5 einstellen, autoklavieren

### 3.31 Gelfiltration

Mithilfe von Gelfiltration ist es möglich, Proteine in ihrem nativen Zustand nach ihrer Größe aufzutrennen und so das Molekulargewicht zu bestimmen.

Die Gelfiltrationsexperimente konnten freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Juniorprof. Dr. Keller (AG Molekulare Biophysik, TU Kaiserslautern) durchgeführt werden.

Zur Gelfiltration im analytischen Maßstab wurde ÄKTA<sup>TM</sup>purifier 100 (GE Healthcare) und eine Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) Gelfiltrationssäule mit einem Säulenvolumen von 24 ml bei 4°C verwendet. Die Säule wurde vor Benutzung mit 3 Säulenvolumen ( $V_C$ ) des Puffers, in dem sich das Protein befand, bei einer Flussrate von 0,5 ml/min gespült. Um über das Elutionsvolumen ( $V_{el}$ ) auf das Molekulargewicht schließen zu können, wurde die Säule mit Proteinen bekannter Größe nach Herstellerangaben kalibriert (Gel Filtration Calibration Kits Low Molecular Weight, GE Healthcare). 500 µl der zu untersuchenden Proteinlösung (0,3 – 0,7 mg/ml) in PBSKM (Tabelle 3.31) wurden bei 4°C und 14.000 g 10 min zentrifugiert, bevor sie über einen 200 µl großen Loop auf die Säule gegeben wurden. Die Flussrate betrug hierbei 0,8 ml/min. Ab dem Totvolumen ( $V_0 = 8,91$  ml) wurden Elutionsfraktionen zu 250 µl in einer Mikrotiterplatte (Fraction Collector Frac-950, GE Healthcare) aufgefangen und bis

zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Auswertung der kontinuierlichen Absorptionsmessung erfolgte mit der zugehörigen Software (UNICORN<sup>TM</sup>5.2, GE Healthcare).

### 3.32 Protein-Interaktionsstudien mittels Dot Blot

Die Analyse von Protein-Interaktionen wurde mithilfe eines Dot Blots durchgeführt. Dazu wurden mögliche Interaktionspartner des zu testenden Proteins in verschiedenen Mengen (0,2 – 5 µg in PBSKM) auf eine trockene, positiv geladene Nylonmembran (Roche) aufgetropft, wobei das Volumen 2 µl betrug, um die Spots möglichst klein zu halten. Die getrocknete Membran wurde mit 5 % Magermilchpulver in 1 x PBS (Tabelle 3.33) für 30 min schwenkend bei RT geblockt, um die unspezifische Bindung des zu testenden Proteins an die Membran zu verhindern. Nach Waschen der Membran mit PBST (Tabelle 3.33) wurde diese mit dem zu testenden Protein (100 µg/ml) für 1 h schwenkend bei RT inkubiert. Die Proteinlösung wurde mit PBST ausgewaschen, bevor die Membran analog zur Vorgehensweise bei einem Western Blot (3.30) mit primären proteinspezifischen und an alkalische Phosphatase gebundenen sekundären Antikörpern inkubiert wurde. Auch die Farbreaktion wurde wie bei einem Western Blot durchgeführt.

### 3.33 Protein-Interaktionsstudien mittels Crosslink durch Glutaraldehyd

Durch die Reaktion der Aldehydgruppen von Glutaraldehyd mit Aminogruppen von Proteinen ist es möglich, Proteine kovalent miteinander zu verbinden. Wechselwirken Proteine miteinander, z.B. bei der Bildung von Dimeren, so befinden sie sich in einem sehr kleinen Abstand zueinander und es kann eine Verlinkung mittels Glutaraldehyd stattfinden.

2 µg des zu untersuchenden Proteins wurden in einem Volumen von 20 µl in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) mit 2 µl einer Glutaraldehyd-Verdünnung (50 % reinst, AppliChem) für 30 min bei RT inkubiert. Die Endkonzentration von Glutaraldehyd lag zwischen 0,5 % und 0,01 %. Die Reaktion wurde mit 2 µl 1 M Tris/HCl (pH 8) gestoppt.

### 3.34 Protein-Strukturanalyse mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) kann der Anteil an  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und unstrukturierten Regionen eines Proteins (random coil) bestimmt werden. Dazu werden Unterschiede in der Absorption von rechts- und linkspolarisiertem Licht durch das zu untersuchende Protein in einem bestimmten Wellenlängenbereich genutzt. Die verschiedenen Strukturelemente besitzen charakteristische Spektren, in die die Messkurve durch Proteinstrukturanalyse nach Brahms zerlegt werden kann (Brahms *et al.*, 1980). Durch stufenweise Erhöhung der Temperatur auf 94°C kann die Schmelztemperatur eines Proteins bestimmt werden, da die Strukturänderung eine Veränderung des Spektrums bewirkt.

Für die Durchführung der CD-Spektroskopie standen freundlicherweise Geräte in der Arbeitsgruppe von Juniorprof. Dr. Keller (AG Molekulare Biophysik, TU Kaiserslautern) zur Verfügung.

Die Messungen erfolgten mit dem Zirkulardichroismus-Spektrometer Chirascan plus (Applied Photophysics) in einer 1 mm Quarzglasküvette (polarimetrisch geprüft) bei einer Betriebstemperatur von 20°C. Das Spektrum wurde in einem Wellenlängenbereich von 260 – 175 nm in 1 nm-Schritten bei einer Bandbreite von 1 nm bestimmt. Das Gerät wurde durch eine Messung mit einer leeren Küvette geeicht, zwei Messungen mit 500  $\mu$ l 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) dienten als Referenz. Zur Bestimmung des CD-Spektrums des zu analysierenden Proteins wurden 500  $\mu$ l einer 10  $\mu$ M Lösung in Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) eingesetzt. Alle Messungen wurden in derselben Küvette durchgeführt.

Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte in einem Temperaturbereich von 20 – 94°C in 0,5°C-Schritten bei einer Heizrate von 1°C/min. Die Absorption wurde bei 222, 208 und 195 nm für 4 s pro Wellenlänge bestimmt. Nach Fertigstellung der Schmelzkurve wurde erneut das CD-Spektrum der auf 20°C abgekühlten Probe bestimmt.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Messungen errechnet. Bei Diskrepanzen in der Proteinkonzentration zweier Proteinlösungen, deren Spektren miteinander verglichen werden sollten, wurde eine Normalisierung der Konzentration durchgeführt. Die Einheit des Zirkulardichroismus ist als molare Elliptizität angegeben:  $\Theta_{MRW}$  [ $^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ ].



### 3.35 Konstruktion der Stämme mit Deletionen im ESX-1 Locus

#### 3.35.1 Deletion von *esxB* in *S. oralis* Uo5 mittels Kanamycin-Resistenzkassette

Die Deletion von *esxB* in *S. oralis* Uo5 erfolgte mithilfe der Kanamycin-Resistenzkassette von pUC *aphIII* (Tabelle 3.6), die anstelle des Gens als selektierbarer Marker eingefügt wurde. Dazu wurden drei PCR-Fragmente (3.17) mithilfe der iProof-Polymerase und den in Tabelle 3.10 angegebenen Primern generiert. Dabei entsprachen Produkt A und C ca. 1000 bp des *S. oralis* Uo5-Genoms up- und downstream von *esxB*, die Kanamycin-Resistenzkassette Produkt B. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass die Amplifikate ca. 40 bp überlappten. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese als Template in einer überlappenden PCR (3.17.2) eingesetzt, die ein Gesamt-Fragment aus den drei Produkten A-C ergab. Dieses Fragment wurde in *S. oralis* Uo5 transformiert (3.9), wobei *esxB* mittels homologer Rekombination durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt wurde. Die Selektion fand bei 200 µg/ml Kanamycin statt, Transformanten wurden durch Sequenzierung überprüft. Abbildung 7.2 zeigt die Sequenz des Deletionskonstruktes.

#### 3.35.2 Deletion von *esxA*, *essC* und *ter\_esxA* in *S. oralis* Uo5 mittels Janus-Kassette

Mithilfe der Janus-Kassette sind Deletionen ohne Verbleib einer Resistenzkassette im Genom von *S. pneumoniae* möglich (Sung *et al.*, 2001). Die Janus-Kassette trägt die Gene für Kanamycinresistenz (*aphIII*) und für Streptomycin-Sensitivität (*rpsL*), wobei *rpsL* dominant ist. Als Ausgangsstamm wird ein Stamm mit einer Mutation in *rpsL* verwendet, die Streptomycin-Resistenz verleiht. In einem ersten Schritt wird das gewünschte Gen mittels Janus-Kassette unter Kanamycin-Selektion deletiert, wobei die Janus-Kassette zusätzlich Streptomycin-Sensitivität verleiht. Der zweite Schritt besteht darin, die Janus-Kassette wieder zu entfernen, was durch homologe Rekombination mit einem DNA-Fragment geschieht, das an dieser Stelle ins Genom eingebracht werden soll. Die Selektion erfolgt bei diesem Schritt mit Streptomycin, da der Stamm seine Streptomycin-Resistenz durch Entfernen der Janus-Kassette zurückerhält und gleichzeitig die Kanamycin-Resistenz verliert.

Zuerst musste der Streptomycin-resistente Ausgangsstamm *S. oralis* Uo5 str41 hergestellt werden. Dazu wurde *S. oralis* Uo5 mit DNA des Stammes *S.p.* RKL242 (Tabelle 3.3) transformiert (3.9), wobei die Selektion auf 200 µg/ml Streptomycin stattfand. Durch Sequenzierung wurde die Mutation K56T (*rpsL41*) bestätigt.

Mithilfe der in Tabelle 3.9, Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 aufgeführten Primer wurden pro Deletion drei Einzel-PCRs mithilfe der iProof-Polymerase durchgeführt (3.17), wobei PCR 1 und 3 die up- und downstream-Bereiche des zu deletierenden Gens und PCR 2 die Janus-Kassette amplifizierte. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass zwischen den drei Fragmenten überlappende Bereiche von ca. 40 bp entstanden. Diese Fragmente wurden mithilfe einer überlappenden PCR miteinander verbunden und amplifiziert. Durch Transformation in *S. oralis* Uo5 str41 und Selektion auf 200 µg/ml Kanamycin wurde das zu deletierende DNA-Fragment durch die Janus-Kassette ersetzt. In einer zweiten Transformation wurde die Janus-Kassette durch homologe Rekombination mit dem gewünschten DNA-Fragment ersetzt. Bei der Deletion von *esxA* und *essC* bestand dieses Fragment aus einer überlappenden PCR der up- und downstream-Bereiche (ca. 1 kb) und den ersten und letzten Basen (kodierend für ca. 10 AS) des Gens, womit die Konstruktion eines Minigens erreicht wurde. Die Sequenz der Minigene mit den umliegenden Sequenzbereichen sind in Abbildung 7.1 (*S. oralis* Uo5  $\Delta$ esxA), Abbildung 7.3 (*S. oralis*  $\Delta$ essC) und Abbildung 7.4 (*S. oralis*  $\Delta$ ter\_esxA) dargestellt.

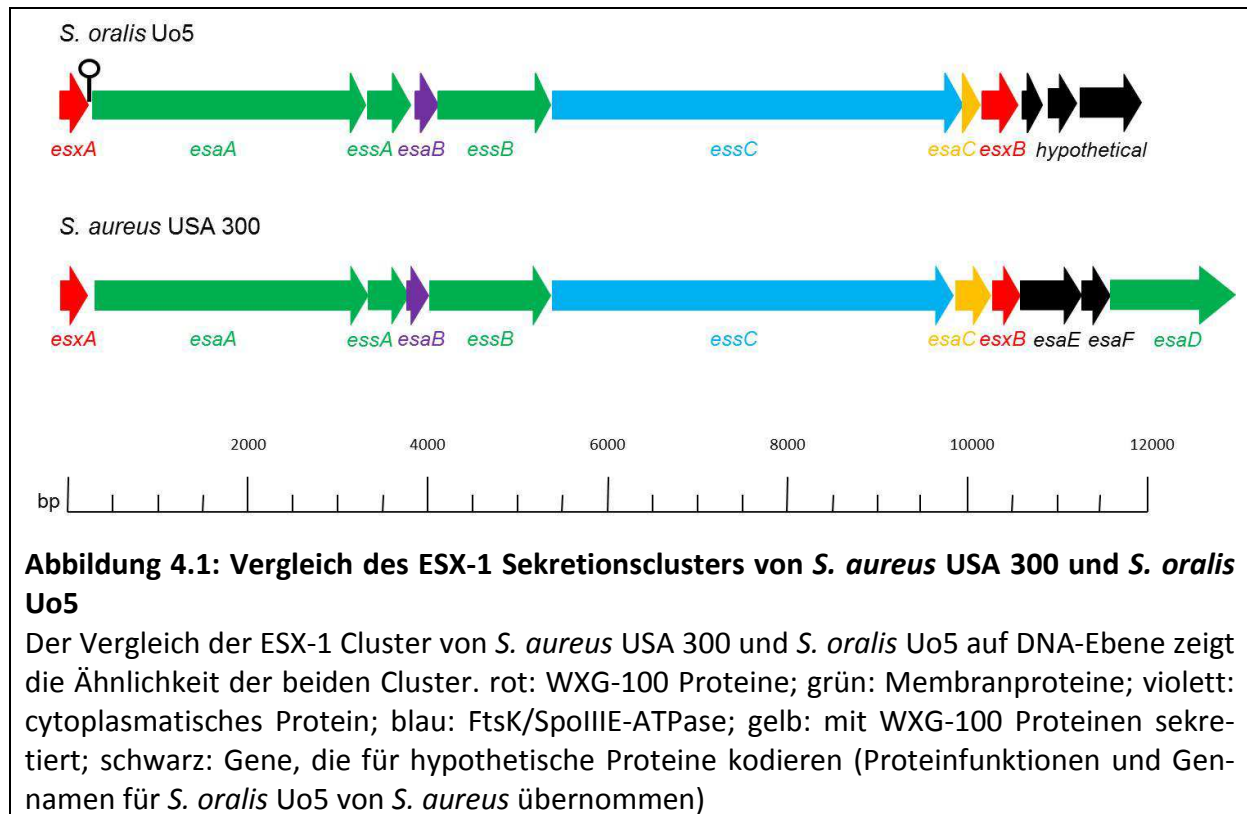
## 4 ERGEBNISSE

Das ESX-1 Cluster von *S. oralis* Uo5 weist einige Besonderheiten auf. Da bisher nur experimentelle Daten über die homologen Cluster aus Mycobakterien und *S. aureus* vorliegen, soll in dieser Arbeit am Beispiel von *S. oralis* Uo5 zum ersten Mal ein ESX-1 Sekretionssystem in Streptokokken untersucht werden. Dabei beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragen:

Handelt es sich bei dem putativen Terminator zwischen *esxA* und *esaA* um einen funktionellen Terminator? Werden die WXG-100 Proteine sekretiert und welche Eigenschaften besitzen diese? Ist EssC mit den FtsK/SpoIIIE-Domänen auch in *S. oralis* essentiell für die Sekretion der WXG-100 Proteine? Abschließend soll analysiert werden, wie das ESX-1 Cluster in der Gattung *Streptococcus* verbreitet und aufgebaut ist.

### 4.1 Aufbau des ESX-1 Sekretionssystems von *S. oralis* Uo5

In der Genomsequenz von *S. oralis* Uo5 fanden sich Gene, die eine Homologie zu Genen des ESX-1 Sekretionsclusters von *S. aureus* zeigen. Dieser Locus wurde analysiert, wobei festgestellt wurde, dass *S.o.* Uo5 die Sequenz eines zu *S. aureus* ähnlichen ESX-1 Clusters trägt (Abbildung 4.1).



Der Sequenzabschnitt im Genom von *S. oralis* Uo5 zeigt eine sehr große Ähnlichkeit zu dem ESX-1 Locus von *S. aureus*. Diese Homologie besteht allerdings nur unter den ersten acht Genen des Clusters. In der folgenden Tabelle sind die Homologien der einzelnen Proteine zu den Proteinen von *S. aureus* aufgeführt.

Tabelle 4.1: Homologie der ESX-1 Proteine von *S. oralis* Uo5 und *S. aureus* USA 300

Protein	Anzahl AS <i>S.o.</i>	Anzahl AS <i>S.a.</i>	Homologie [%]	Bemerkungen
<b>EsxA</b>	94	97	48	WXG-100 Motiv
<b>EsaA</b>	1009	1009	23	
<b>EssA</b>	154	152	-	TMD
<b>EsaB</b>	79	80	-	32 % zu <i>Listeria</i>
<b>EssB</b>	423	444	28	
<b>EssC</b>	1514	1479	43	
<b>EsaC</b>	62	130	-	Spezies-spezifisch
<b>EsxB</b>	129	104	-	WXG-100 Motiv

-: keine Homologie durch Blast identifizierbar

Führt man einen Blast mit den Proteinsequenzen der ESX-1 Proteine von *S. oralis* Uo5 durch, erhält man für EsxA, EsaA, EssB und EssC Homologien zwischen 23 und 48 %, wobei die Größen der Proteine weitestgehend gleich sind. Für die Proteine EssA, EsaB, EsaC und EsxB erhält man keine Homologie, allerdings besitzen diese eine entsprechende Größe und/oder Struktureigenschaften. So besitzt EssA von *S. oralis* Uo5 ebenfalls eine Transmembrandomäne und EsxB ein WXG-100 Motiv. Für EsaB besteht eine Homologie von 32 % zu EsaB von *Listeria monocytogenes*. Für EsaC konnte keine Homologie gefunden werden, allerdings handelt es sich bei EsaC um ein Spezies-spezifisches Protein (Burts *et al.*, 2008).

Die Homologie der beiden Cluster endet downstream von *esxB*. Die darauffolgenden Gene sind weder in Sequenz noch in Größe homolog zu den Genen von *S. aureus*. Auch das kürzlich identifizierte *esaD* ist in *S. oralis* Uo5 nicht vorhanden. Bei der Suche nach *esaD* im Genom von *S. oralis* Uo5 konnten ebenfalls keine Homologe gefunden werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den ESX-1 Clustern von *S. oralis* Uo5 und *S. aureus* ist der intergene Bereich zwischen *esxA* und *esaA*, der im folgenden Kapitel beschrieben wird.

## 4.2 Transkription des ESX-1 Sekretionsclusters von *S. oralis* Uo5

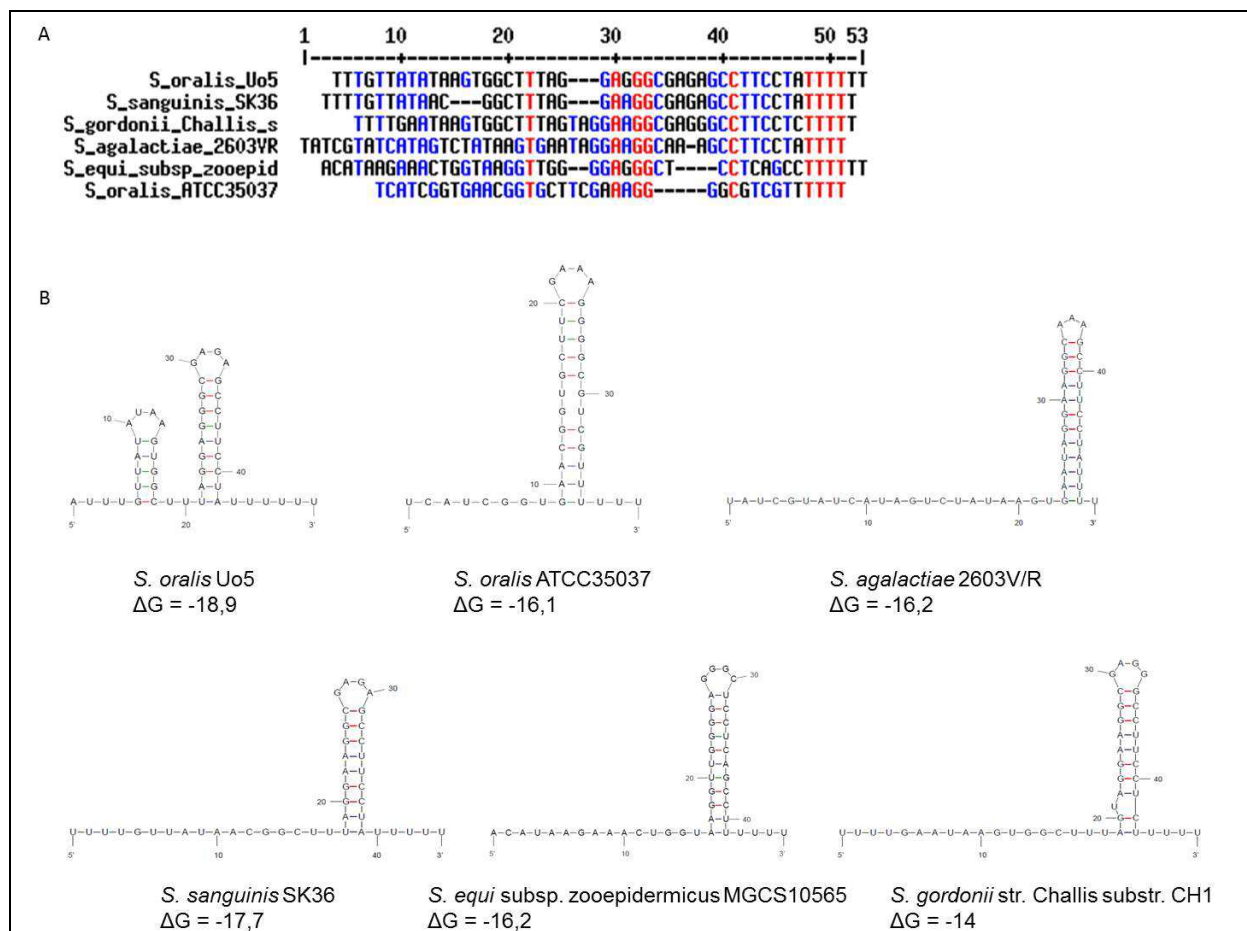
Bislang gibt es wenige Organismen, bei denen die Regulation des ESX-1 Clusters bekannt ist. So verläuft die Regulation in *S. aureus* post-transkriptionell über EsaB und EsaC, wobei EsaB die Produktion von EsaC reprimiert. Lediglich während des Infektionsprozesses findet diese Repression nicht statt, EsaC wird produziert und zusammen mit EsxA und EsxB sekretiert (Burts *et al.*, 2008).

Auch in *M. tuberculosis* findet eine post-transkriptionelle Regulation von ESX-1 mittels einer Protease (MycP1, Ohol *et al.*, 2010) statt, die den Sekretionsapparat-stabilisierenden Faktor EspB reguliert.

Bisher ist kein Organismus bekannt, der die Expression des ESX-1 Clusters durch einen internen Terminator reguliert.

4.2.1 Ein Terminator zwischen *esxA* und *esaA*?

Durch Sequenzanalyse fiel der Bereich zwischen dem ersten und dem zweiten Gen auf, also zwischen *esxA* und *esaA*, da diese Sequenz einen putativen Terminator ausbilden könnte, der ein GC-reiches 5'-Ende, das die Stamm-Schleife-Struktur bildet, und einen Poly-U-Stretch besitzt. Faltet man diese Sequenz mithilfe des Mfold-Programmes von Zuker (Zuker, 2003), so erhält man zwei Stamm-Schleife-Strukturen, wovon die zweite aus vielen stabilisierenden GC-Paaren besteht (Abbildung 4.2 B, oben links). Ein  $\Delta G$ -Wert von -18,9 KJ/mol bei *S. oralis* Uo5 sagt zusätzlich eine hohe Stabilität dieser Struktur voraus.



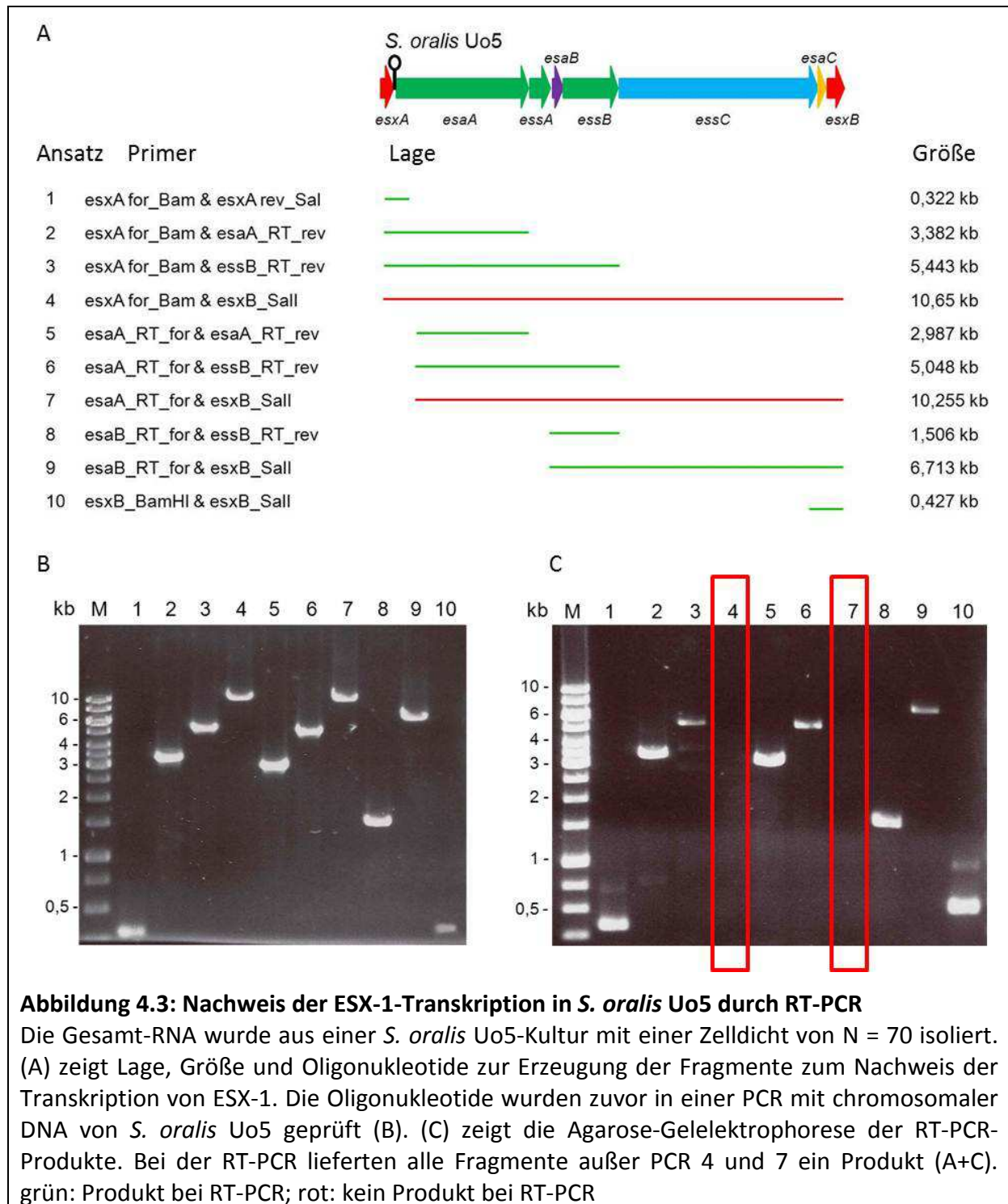
**Abbildung 4.2: Konservierung des Terminators zwischen *esxA* und *esaA* in Streptokokken**

(A) Alignment des intergenen Bereiches zwischen *esxA* und *esaA* von Vertretern der Streptokokken-Arten, in denen WXG-100 Proteine annotiert sind. Stark konserviert (rote Buchstaben) bzw. konserviert (blaue Buchstaben) sind das 3'-Ende, das den Poly-U-Stretch bildet und der GC-reiche Mittelbereich. Die Sequenzen stammen aus den in Tabelle 3.5 angegebenen Genomen und wurden mittels des Programmes MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) verglichen. (B) Die in (A) gezeigten Sequenzen wurden mittels des Mfold-Programmes von Zuker (Zuker, 2003) gefaltet. Dieses Programm berechnet auch die aufgeführten  $\Delta G$ -Werte, die in KJ/mol angegeben sind.

Die Sequenz des putativen Terminators zwischen *esxA* und *esaA* scheint innerhalb der Streptokokken, die ein ESX-1 Sekretionssystem besitzen, konserviert zu sein. Lediglich bei *S. galloyticus* war kein Terminator identifizierbar, da *esxA* auf dem komplementären Strang liegt (Abbildung 4.21). Dieser Sequenzbereich wurde auch in *S. aureus* analysiert, allerdings war hier keine Terminatorsequenz ersichtlich und auch die Faltung mittels des Mfold-Programmes ergab keine Terminatorstruktur. Somit scheint diese Sequenz Streptokokken-spezifisch zu sein. Ob es sich hierbei um einen funktionellen Terminator handelt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

#### 4.2.2 Nachweis der ESX-1-Transkription in *S. oralis* Uo5 durch RT-PCR

Um die Transkription des ESX-1 Sekretionsclusters nachzuweisen, wurden zehn verschiedene RT-PCRs durchgeführt (Kapitel 3.19), die sich durch die Kombination der in Tabelle 3.14 angegebenen Oligonukleotide ergaben. Abbildung 4.3 A zeigt die Länge und Lage der verschiedenen Konstrukte.



Alle Oligonukleotidpaare ergaben bei einem Test mit chromosomaler DNA von *S. oralis* Uo5 die gewünschten Produkte (Abbildung 4.3 B). Nach der reversen Transkription und Durchführung der PCRs mit der erzeugten cDNA lieferten außer PCR 4 und 7 alle PCRs das erwartete Produkt (Abbildung 4.3 A und C). Da die Fragmente, die ein Produkt bei der RT-PCR ergaben, überlappend konstruiert worden waren, kann anhand dieser Ergebnisse die Transkription des kompletten ESX-1 Clusters von *S. oralis* Uo5 bestätigt werden.



Bei PCR 4 und 7 handelt es sich um Fragmente mit einer Größe über 10 kb. Die Primer lieferten zwar ein Produkt bei den Kontrollen mit chromosomaler DNA, jedoch nicht bei der PCR mit cDNA. Die Ursache dafür könnte z.B. bei der Reversen Transkriptase liegen, die Fragmente dieser Größe nicht generieren kann.

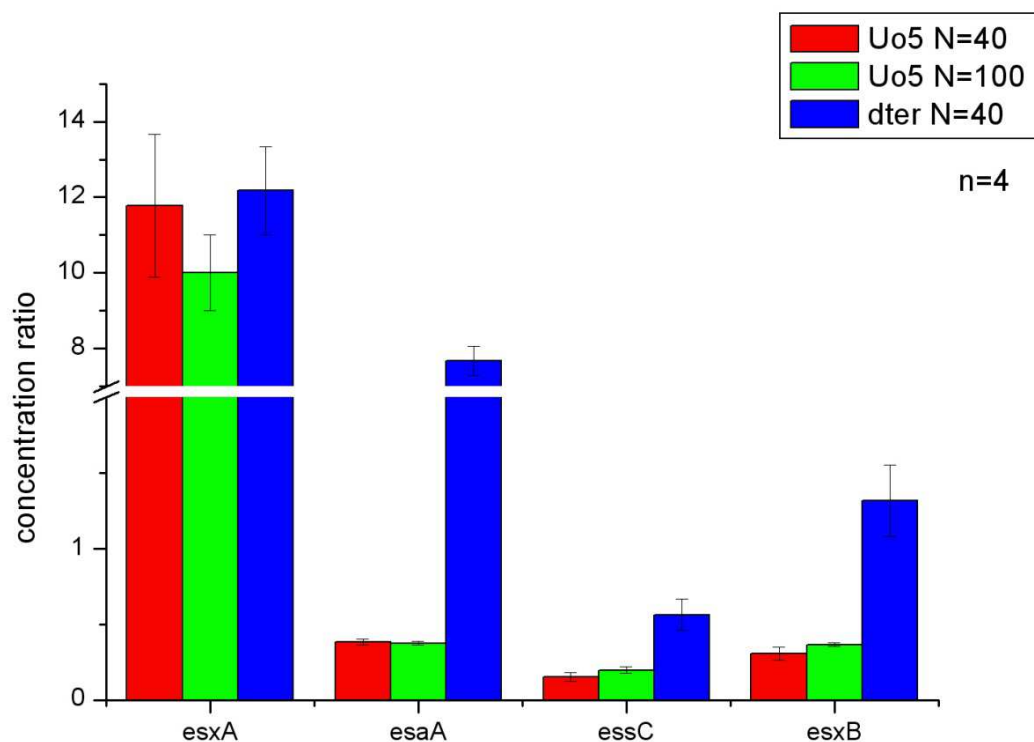
#### 4.2.3 Nachweis der Transkription einzelner Gene des ESX-1 Sekretionsclusters von *S. oralis* Uo5 mittels qRT-PCR und Northern Blot

Im vorigen Kapitel wurde die Transkription des ESX-1 Clusters anhand von verschiedenen RT-PCRs nachgewiesen. Diese Resultate gewähren allerdings keinen Aufschluss über Transkriptmengen und -größen. Um zu untersuchen, ob es sich bei der putativen Terminatorsequenz zwischen *esxA* und *esaA* *in vivo* um einen funktionellen Terminator handelt, wurden die relativen Transkriptmengen von *esxA*, *esaA*, *essC* (kodierend für den Transporter) und *esxB*, dem letzten Gen des Clusters, mittels qRT-PCR (3.20) unter Verwendung der in Tabelle 3.17 angegebenen Oligonukleotide untersucht. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde diese Analyse zusätzlich mit einem Stamm durchgeführt, in dem der Terminator deletiert worden war (*S. oralis* Uo5  $\Delta$ ter\_*esxA*, N = 40). Die Analyse der Transkriptmengen erfolgte im Wildtyp zusätzlich bei einer Zelldichte von N = 100, um die Abhängigkeit der Transkription von der Zelldichte beurteilen zu können.

(A)

Gen	Concentration Ratio (Gen/ <i>gyrA</i> )		
	Uo5 N = 40	Uo5 N = 100	Uo5 $\Delta$ ter_esaA N = 40
<i>esxA</i>	11,78 $\pm$ 1,8	10 $\pm$ 1	12,18 $\pm$ 1,2
<i>esaA</i>	0,38 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,01	7,68 $\pm$ 0,38
<i>essC</i>	0,15 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,1
<i>esxB</i>	0,31 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,01	1,32 $\pm$ 0,23

(B)



**Abbildung 4.4: Transkriptionsanalyse der Gene *esxA*, *esaA*, *essC* und *esxB* von *S. oralis* Uo5 bei einer Zelldichte von N = 40 und N = 100 und von *S. oralis* Uo5  $\Delta$ ter\_esaA mittels qRT-PCR**

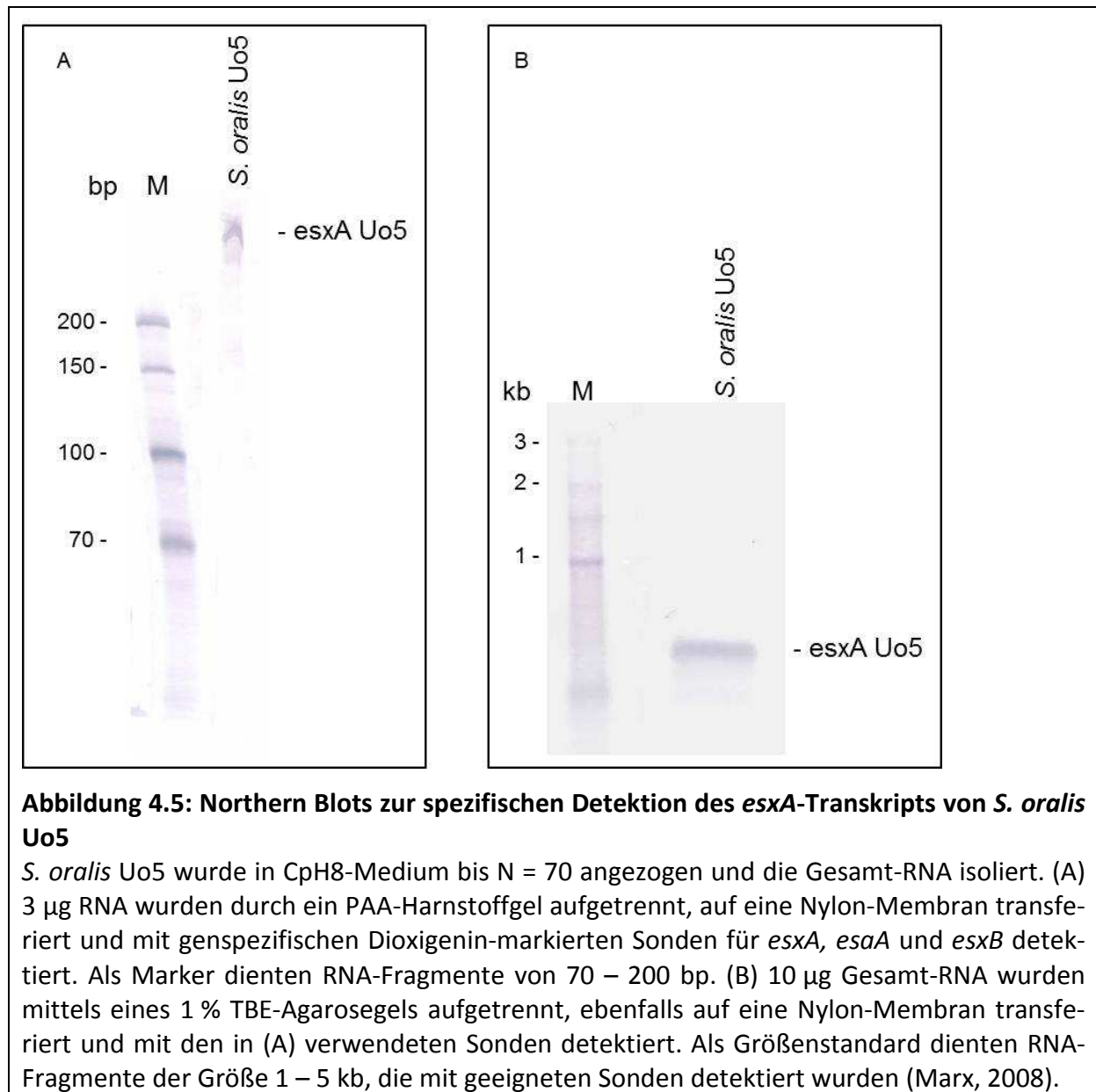
Die oben angegebenen Stämme wurden in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von N = 40 bzw. N = 100 angezogen und die Gesamt-RNA isoliert, die nachfolgend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. qRT-PCRs fanden mit genspezifischen Primern statt, als Kontrollgen diente das nicht regulierte Housekeeping-Gen *gyrA*.

(A) zeigt normalisierte Mittelwerte der Concentration ratio der untersuchten Gene (bezogen auf das Kontrollgen *gyrA*) aus vier Versuchen mit Angabe des Standardfehlers. Die Werte sind in (B) graphisch dargestellt.

Die Transkriptmenge von *esxA* übersteigt die der anderen Gene im Wildtyp ( $N = 40$  und  $N = 100$ ) um ein Vielfaches (20 – 80fach), was auf die Funktionalität des putativen Terminators hinweist. Wird der Terminator deletiert, steigt die Transkription der Gene downstream von *esxA*. Die Transkription von *essC* in Uo5  $\Delta$ ter\_esiA ( $0,56 \pm 0,1$ ) ist wiederum geringer als die Transkription von *esaA* ( $7,68 \pm 0,38$ ) in diesem Stamm, wohingegen die Transkriptmenge von *esxB* erneut erhöht ist ( $1,32 \pm 0,23$ ). In der DNA-Sequenz finden sich allerdings keine Hinweise auf einen weiteren Terminator zwischen *esaA* und *essC* und/oder einen Promotor zwischen *essC* und *esxB*, weswegen die Ursache dieses Unterschiedes nicht bekannt ist.

Die Transkription aller analysierten Gene ist im Wildtyp bei einer Zelldichte von  $N = 40$  und  $N = 100$  nahezu identisch, was auf eine Wachstumsphasen-unabhängige Transkription hindeutet.

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Transkriptionsanalyse mittels qRT-PCR wurden Northern Blots (3.21) mit genspezifischen Sonden für *esxA*, *esaA* und *esxB* (Tabelle 3.15) durchgeführt.

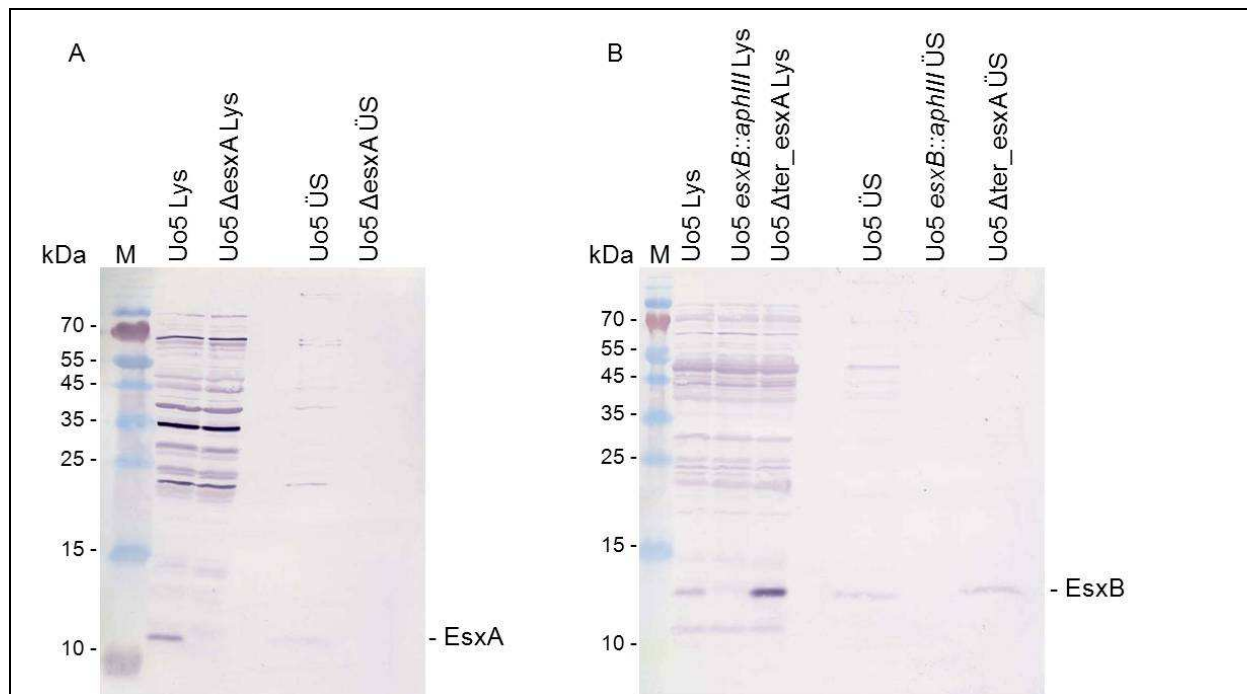


Mit den in Abbildung 4.5 gezeigten Northern Blots konnten lediglich *esxA*-Transkripte detektiert werden, die der Größe des Gens entsprechen (285 bp). Die Detektion von *esaA*- bzw. *esxB*-Transkripten war nicht möglich, was zum Einen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der qRT-PCR durch die kleine Transkriptmenge begründet sein kann, zum Anderen durch Probleme bei der Übertragung von großen RNA-Fragmenten aus dem Gel auf die Membran. Dies war auch am Beispiel des RNA-Größenstandards (1 – 5 kb) zu beobachten, da hier die Fragmente > 3 kb nicht nachzuweisen waren.

### 4.3 Nachweis der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5

Nachdem gezeigt wurde, dass *esxA* und *esxB* von *S. oralis* Uo5 transkribiert werden, sollte nun analysiert werden, ob die Genprodukte nachweisbar sind. Dabei wurde zusätzlich untersucht, wo die Proteine lokalisiert sind.

Zum Nachweis der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 wurden die in Kapitel 3.29 beschriebenen Antiseren verwendet. Als Kontrolle diente jeweils ein Uo5-Derivat, in dem das Gen für EsxA bzw. EsxB deletiert worden war.



**Abbildung 4.6: Nachweis von EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 in Lysat und Überstand**

Kulturen mit einer Zelldichte von  $N = 70$  in CpH8-Medium wurden vom Kulturmedium separiert, die Zellen wurden lysiert (3.23) und die im Kulturüberstand enthaltenen Proteine mit TCA und DOC gefällt (3.22). Über ein 15 % SDS-PAA-Gel (3.24) wurden Lysate und gefällte Proteine der Überstände aufgetrennt, wobei die Menge des Lysats 1 ml Kultur mit einer Zelldichte von  $N = 20$ , die Menge des Überstandes 1 ml einer Kultur von  $N = 70$  entspricht. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert ((A)  $\alpha$ EsxA F2 1:10.000, (B)  $\alpha$ EsxB M 1:10.000).  $\alpha$ arabbit-Antikörper dienten als sekundäre Antikörper, die Detektion erfolgte mit NBT/BCIP Stammlösung.

Lys: Lysat; ÜS: Überstand

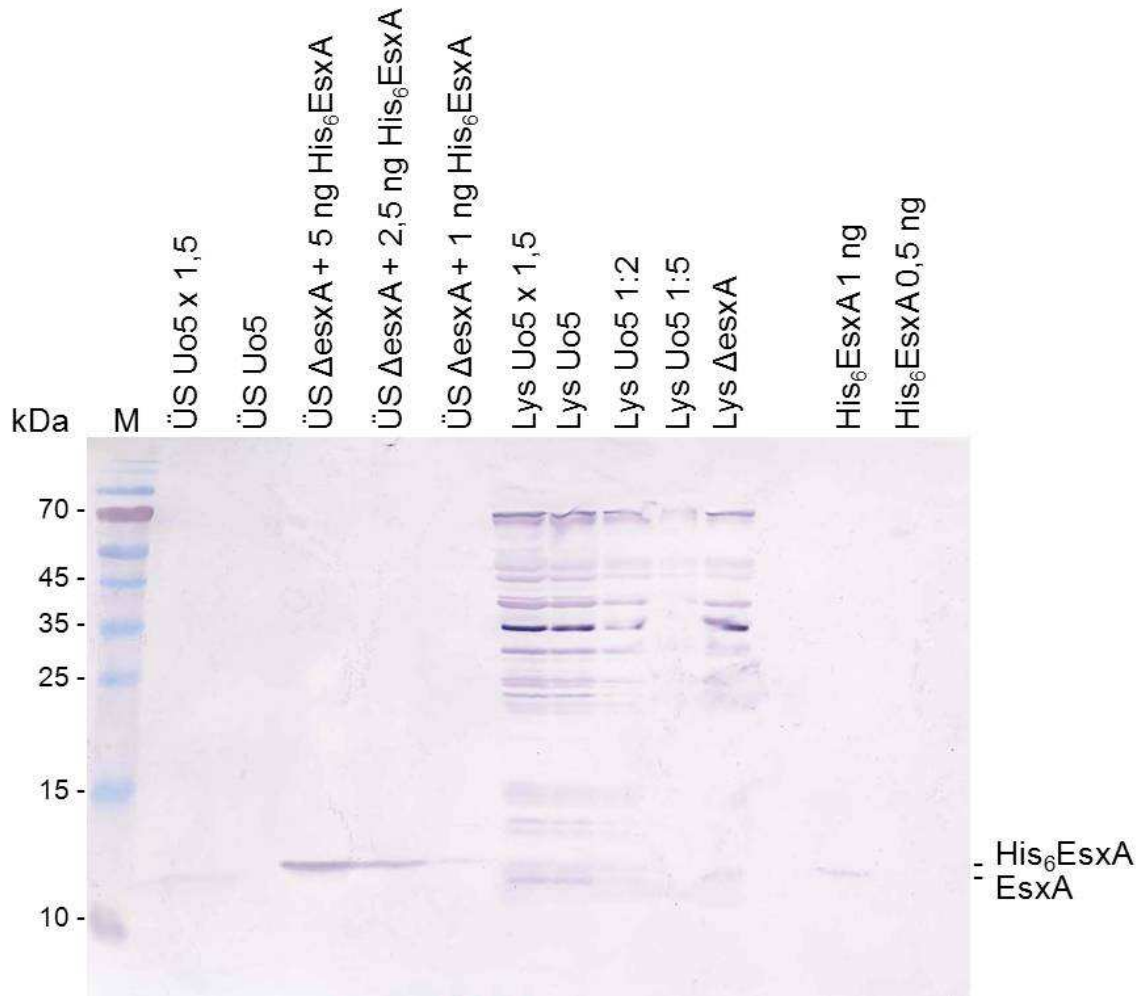
EsxA konnte mit dieser Methode sowohl im Lysat als auch im Zellüberstand des Wildtyps *S. oralis* Uo5 nachgewiesen werden (Abbildung 4.6 A,  $M_w$  EsxA: 10,8 kDa); kein Signal wurde in den Proben des Deletionsderivates Uo5  $\Delta$ esxA erhalten. Die größere EsxA-Menge wurde im Zelllysate nachgewiesen, eine sehr geringe im Zellüberstand, was darauf hindeutet, dass ein Großteil von EsxA im Cytoplasma verbleibt, ein Teil jedoch sekretiert wird.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für den Nachweis von EsxB (Abbildung 4.6 B). Auch hier konnte das Protein spezifisch mithilfe von  $\alpha$ EsxB M im Zelllysate und im Überstand des Wildtyps Uo5 nachgewiesen werden, das Deletionsderivat (Uo5 *esxB::aphIII*) lieferte keine Banden auf der Laufhöhe von EsxB ( $M_w$  EsxB: 14,2 kDa).

Ähnlich wie im Falle von EsxA war deutlich mehr EsxB im Zelllysate als im Kulturüberstand zu finden.

In Uo5  $\Delta$ ter\_esxA (der Stamm, in dem der Terminator zwischen *esxA* und *esxA* deletiert wurde) wurde EsxB im Vergleich zum Wildtyp in deutlich größeren Mengen im Cytoplasma nachgewiesen, was mit der vierfach erhöhten Expression von *esxB* in diesem Stamm korreliert (Abbildung 4.4). Die Signale für EsxB im Überstand sind zu schwach, um über die Proteinmenge eine Aussage zu machen. Eine vierfache Erhöhung der Proteinmenge im Kulturüberstand ist aber nicht zu beobachten.

Um die Menge an WXG-100 Proteinen in einer Zelle (pro cfu) und die Menge an sekretiertem Protein pro Zelle abschätzen zu können, wurden diese in verschiedenen Mengen Zelllysate und Kulturüberstand des Wildtyps *S. oralis* Uo5 auf einem Westernblot detektiert und mit einer bekannten Menge rekombinantem Protein bzw. gefälltem rekombinantem Protein verglichen. Dabei lässt sich zusätzlich eine Aussage über die Effizienz der TCA-Fällung treffen, da die Signale der gefällten und unbehandelten Proben mit bekannten Proteinmengen verglichen werden können.



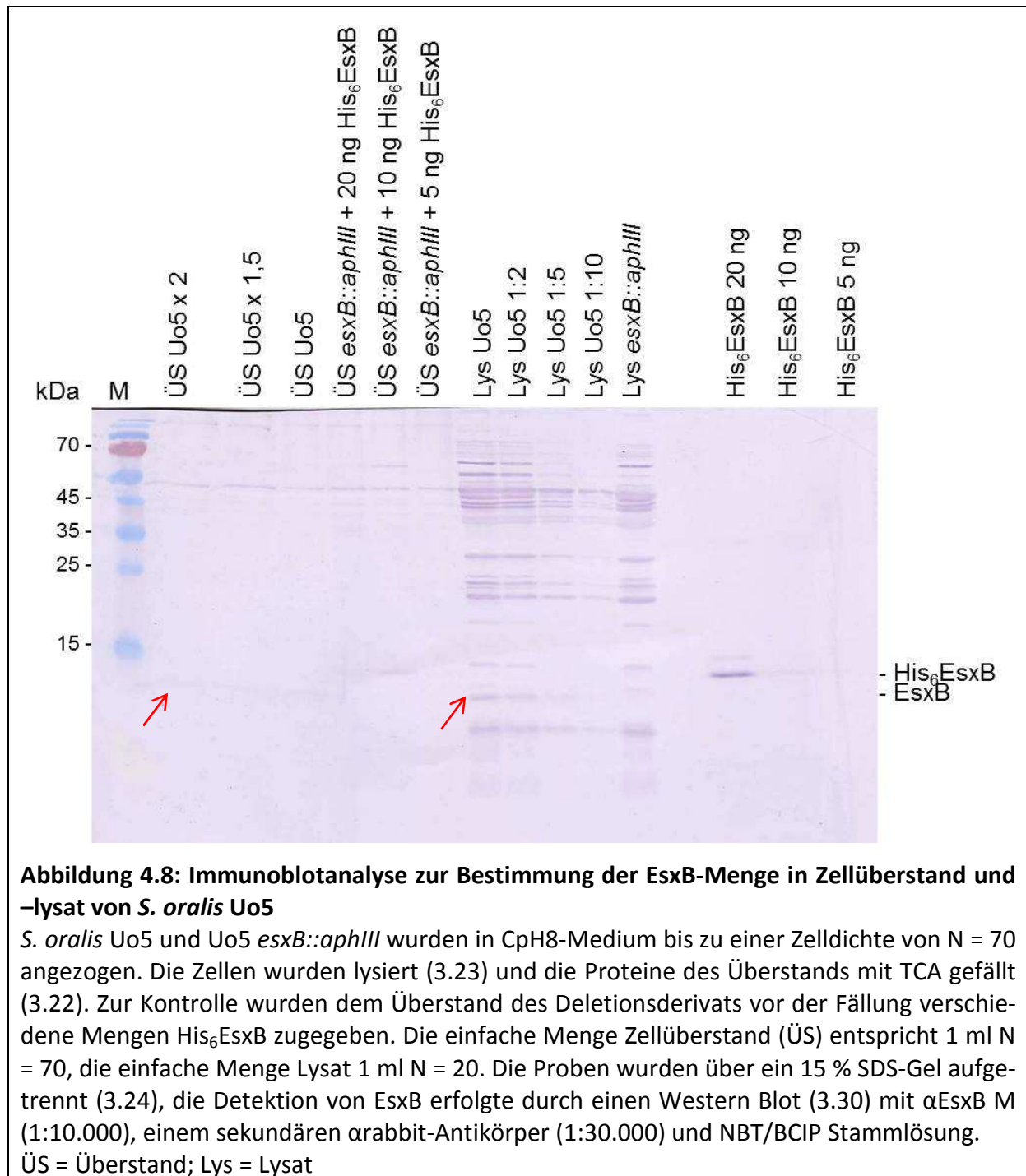
**Abbildung 4.7: Immunoblotanalyse zur Bestimmung der EsxA-Menge in Zellüberstand und –lysat von *S. oralis* Uo5**

*S. oralis* Uo5 und Uo5  $\Delta$ esxA wurden in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von  $N = 70$  angezogen. Die Zellen wurden lysiert (3.23) und die Proteine des Überstands mit TCA gefällt (3.22). Zur Kontrolle wurden dem Überstand des Deletionsderivats vor der Fällung verschiedene Mengen His<sub>6</sub>EsxA zugegeben. Die einfache Menge Zellüberstand (ÜS) entspricht 1 ml  $N = 70$ , die einfache Menge Lysat 1 ml  $N = 20$ . Die Proben wurden über ein 15 % SDS-Gel aufgetrennt (3.24), die Detektion von EsxA erfolgte durch einen Western Blot (3.30) mit  $\alpha$ EsxA F2 (1:10.000), einem sekundären  $\alpha$  rabbit-Antikörper (1:30.000) und NBT/BCIP Stammlösung.

ÜS = Überstand; Lys = Lysat

Mit dieser Methode kann nur eine grobe Abschätzung der EsxA-Menge erfolgen. Dabei wurde von der mittels Nanodrop (3.27.1) bestimmten Proteinkonzentration ausgegangen, bei einem Nephelo-Wert von  $N = 70$  wurde eine cfu von  $4 \times 10^8$  pro ml angenommen, wobei eine cfu aus zwei Zellen besteht (mikroskopische Analysen der Kettenlänge in Abbildung 4.20). Mit diesen Parametern ergeben sich folgende Molekülmengen: Wird angenommen, dass die EsxA-Bande des einfach konzentrierten Lysats der Bande von 1 ng rekombinantem Protein und das EsxA-Signal des 1,5fach konzentrierten Überstands dem von 1 ng gefälltem

Protein entspricht, ergibt sich daraus eine Menge von 255 Molekülen pro Zelle und 47 sekretierten Molekülen pro Zelle.



Für EsxB wurde angenommen, dass die Bande des 1:5 konzentrierten Lysats der Bande von 10 ng rekombinantem Protein und das EsxB-Signal des zweifach konzentrierten Überstands dem von 10 ng gefällttem Protein entspricht, wobei die EsxB-Signale im Überstand des Wild-



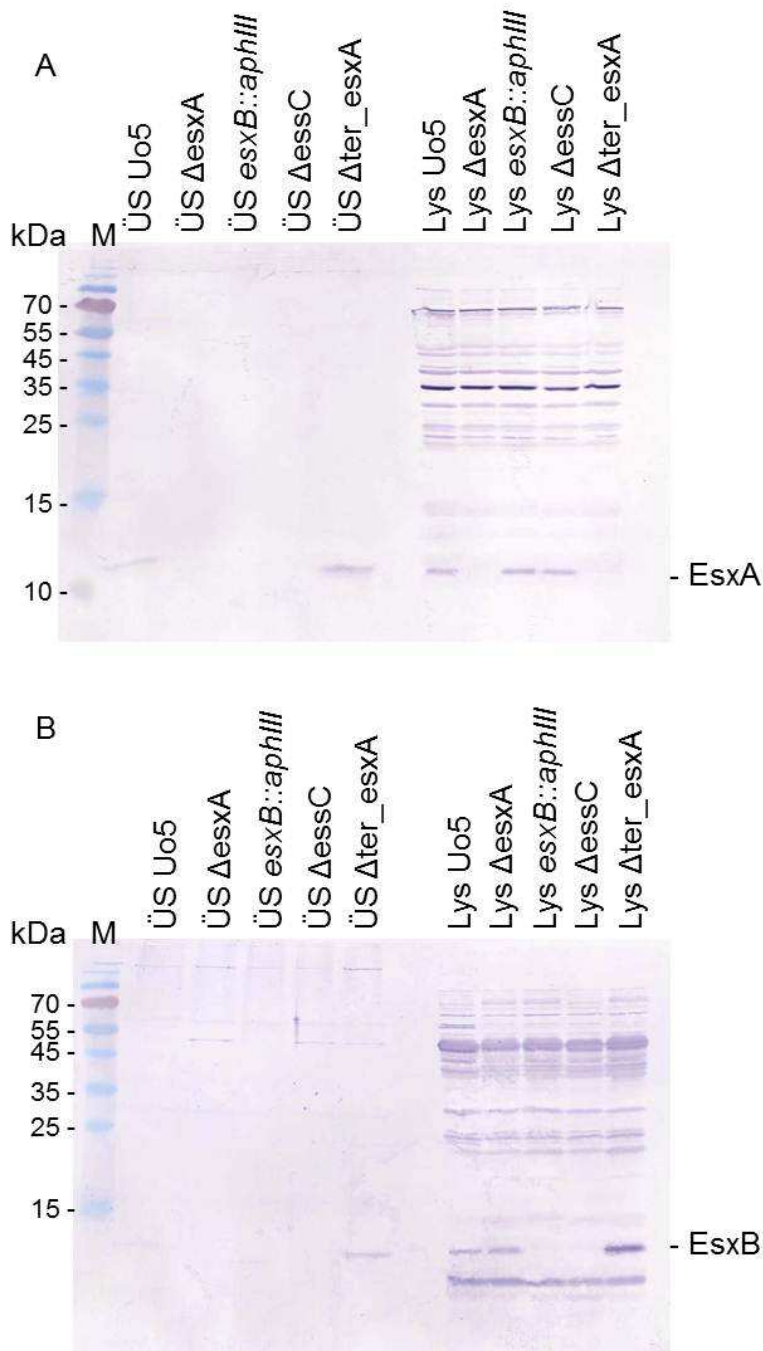
typs in diesem Experiment schwer zu detektieren waren. Daraus ergibt sich für EsxB eine Menge von 9.639 Molekülen pro Zelle und 265 sekretierten Molekülen pro Zelle.

Laut diesen Ergebnissen liegt 40fach mehr EsxB im Vergleich zu EsxA in einer Zelle vor und eine Zelle sekretiert 6-mal mehr EsxB wie EsxA, was nicht mit den Daten der Transkriptmen-genbestimmung übereinstimmt, bei der 38-mal mehr EsxA- als EsxB-Transkript bestimmt wurde (4.2.3).

#### 4.4 Der Transporter EssC und die Sekretion von EsxA und EsxB

Wie werden nun die untersuchten WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 sekretiert? Das Gen *essC* kodiert in *S. aureus* für eine FtsK/SpoIIIE-ATPase, die die Sekretion von EsxA und EsxB katalysiert (Burts *et al.*, 2005). Wird dieses Gen deletiert, findet keine Sekretion von EsxA und EsxB mehr statt. Für die Expression und den Export ist zusätzlich die Anwesenheit beider WXG-100 Proteine erforderlich, bei Fehlen eines der beiden Proteine findet keine Expression und keine Sekretion des jeweils anderen mehr statt (Burts *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit sollte nun die Rolle von EssC bei der Expression und Sekretion der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 untersucht werden. Dazu wurde *S. oralis* Uo5  $\Delta$ essC konstruiert, wobei *essC* mithilfe der Janus-Kassette deletiert wurde (3.35.2). Zelllysate (3.23) und gefällte Zellüberstände (3.22) dieses Stammes sowie des Wildtyps und der Deletionsstämme von *esxA*, *esxB* und des Terminators zwischen *esxA* und *esxA* wurden einer Western Blot Analyse mit EsxA- und EsxB-Antiseren unterzogen, um Expression und Export der WXG-100 Proteine in An- und Abwesenheit des Transporters EssC zu untersuchen.



**Abbildung 4.9: Untersuchung der Sekretion von EsxA und EsxB mittels Western Blot Analyse**

Die Stämme wurden bis zu einer Zelldichte von  $N = 70$  angezogen. Die Zelllysate (1 ml Kultur  $N = 20$ ) und die mit TCA und DOC gefällten Proteine des Überstandes (1 ml  $N = 70$ ) wurden durch ein 15 %iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert ((A)  $\alpha$ EsxA F2 1:10.000, (B)  $\alpha$ EsxB M 1:10.000).  $\alpha$ rabbit-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase dienten als sekundäre Antikörper, die Detektion erfolgte mit NBT/BCIP Stammlösung.

Lys: Lysat; ÜS: Überstand

EsxA ist sowohl im Wildtyp Uo5 als auch in den Zelllysaten der Deletionsderivate von *esxB* und *essC* nachweisbar (Abbildung 4.9 A). Zelllysate der Deletionsmutante des Terminators (Uo5  $\Delta$ ter\_esiA) liefern dagegen kein Signal auf der Laufhöhe von EsxA.

Dass in diesem Stamm allerdings eine Produktion von EsxA stattfindet, zeigt die Detektion des Proteins im Zellüberstand, die sonst nur im Wildtyp möglich war. Das heißt, dass die Stämme mit deletiertem Transporter (*essC*) und deletiertem *esxB* EsxA zwar produzieren, der Export aus der Zelle allerdings nicht stattfindet.

Quantitativ ist festzustellen, dass EsxA beim Wildtyp, bei  $\Delta$ essC und bei *esxB::aphIII* in ungefähr gleicher Menge im Cytoplasma vorliegt. Im Zellüberstand von  $\Delta$ ter\_esiA, bei dem kein EsxA im Cytoplasma detektierbar ist, ist die EsxA-Menge im Zellüberstand im Vergleich zum Wildtyp erhöht.

Ein anderes Bild ergibt sich bei der Detektion von EsxB in diesen Stämmen (Abbildung 4.9 B). Hier konnte EsxB im Zelllysate des Wildtyps, der *esxA*-Deletionsmutante Uo5  $\Delta$ esiA und Uo5  $\Delta$ ter\_esiA nachgewiesen werden, wobei die Menge an EsxB im Zelllysate des Stammes mit deletiertem Terminator größer ist als im Wildtyp. Uo5 *esxB::aphIII* (als Kontrolle) und  $\Delta$ essC zeigen kein EsxB-Signal in den Spuren, in denen deren Zelllysate aufgetrennt wurde.

Bei der Analyse der EsxB-Detektion im Medium ergibt sich das gleiche Bild wie bei EsxA, auch hier ist das Protein lediglich beim Wildtyp und bei Uo5  $\Delta$ ter\_esiA im Überstand nachweisbar, wobei hier ebenfalls die EsxB-Menge im Terminator-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist.

Diese Resultate lassen vermuten, dass es sich bei EssC auch funktionell um ein Homolog der bei *S. aureus* bereits beschriebenen FtsK/SpoIIIE-ATPase handelt, die den Export der beiden WXG-100 Proteine katalysiert (Burts *et al.*, 2005). Bei *S. oralis* Uo5 ist EssC zumindest für den Export von EsxA essentiell, da das Protein im Deletionsstamm Uo5  $\Delta$ essC nur noch im Cytoplasma und nicht mehr im Zellüberstand detektierbar ist.

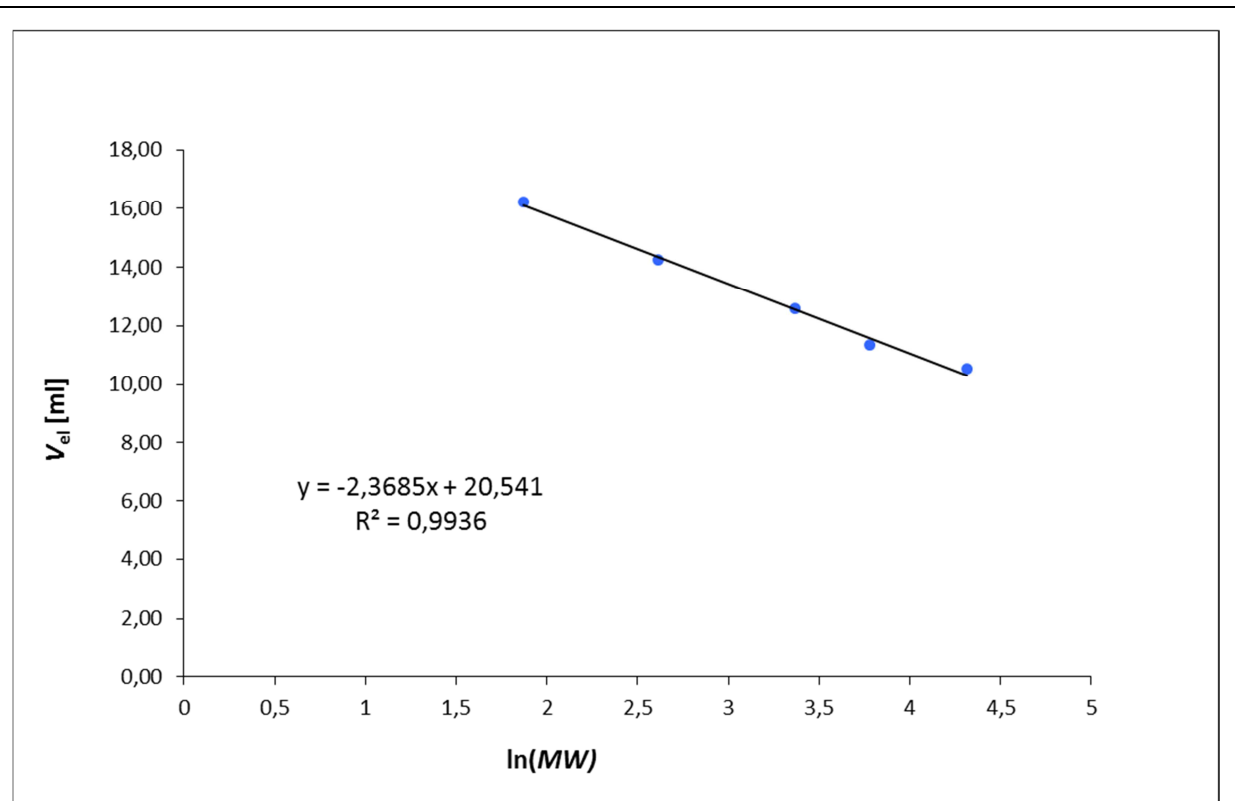
Außerdem liefern diese Ergebnisse eine Aussage über den Export der beiden WXG-100 Proteine bei der Deletion des jeweils anderen Proteins. Fehlt entweder EsxA oder EsxB, wird das andere Protein zwar produziert, jedoch nicht exportiert.

#### 4.5 Struktur, Stöchiometrie und Stabilität der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5

Über die WXG-100 Proteine EsxA und EsxB von *S. aureus* existieren viele experimentelle Daten. Es sollte nun untersucht werden, ob EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 die gleichen Eigenschaften wie ihre Homologe aus *S. aureus* besitzen. Dabei sollte nachgewiesen werden, ob die Sekundärstruktur von EsxA und EsxB in *S. oralis* Uo5 und *S. aureus* vergleichbar ist und ob diese Proteine in *S. oralis* Uo5 ebenfalls Homodimere bilden. Des Weiteren sollte eine Bindung der WXG-100 Proteine an Laminin analysiert werden.

Die beiden WXG-100 Proteine ESAT-6 (EsxA-Homolog) und CFP-10 (EsxB-Homolog) von *M. tuberculosis* liegen als  $\alpha$ -helicale lineare Proteine vor, bei denen die beiden  $\alpha$ -Helices durch eine kurze random coil Struktur, die das WXG-Motiv enthält, getrennt werden (Renshaw *et al.*, 2005; Abbildung 2.4). In diesem Organismus bilden ESAT-6 und CFP-10 ein Heterodimer. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass EsxA von *S. aureus* zwar die gleiche Sekundärstruktur wie ESAT-6 von *M. tuberculosis* aufweist, das Protein allerdings ein relativ stabiles Homodimer bildet, dessen Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen entsteht (Sundaramoorthy *et al.*, 2008). Die Sekundärstruktur von *S. aureus* EsxB ist nicht bekannt. Da das Protein allerdings die gleichen Eigenschaften wie EsxA aufweist und ESAT-6 sowie CFP-10 von *M. tuberculosis* die gleiche Struktur wie EsxA aufweisen, ist davon auszugehen, dass EsxB von *S. aureus* ebenfalls eine sehr ähnliche Struktur ausbildet.

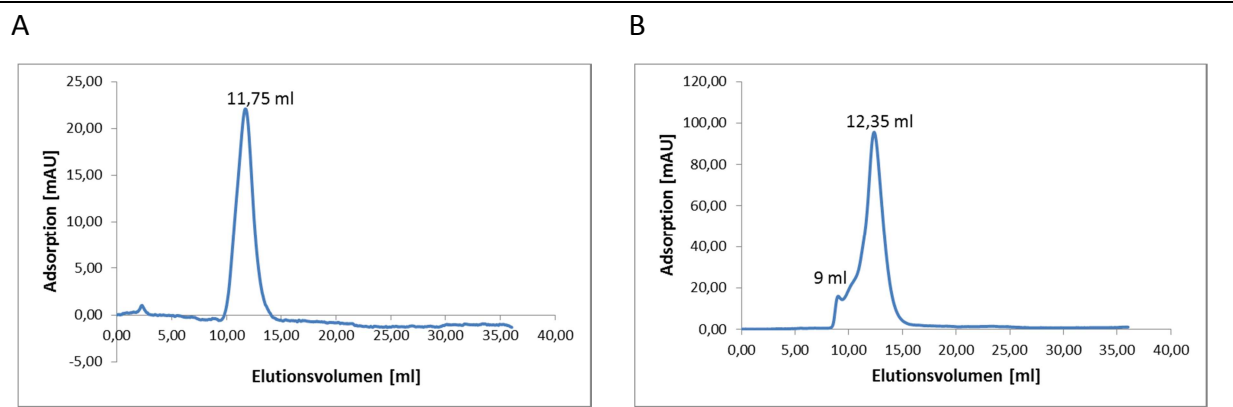
Eine native Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, die Methode der Gelfiltration (3.31), sollte Aufschluss über das Vorliegen von EsxA bzw. EsxB als Homodimer oder Monomer geben. Dazu wurde zunächst die Kalibrierung der Gelfiltrations-säule mit Proteinen bekannter Größe durchgeführt. Allerdings handelt es sich bei den Eichproteinen um globuläre Proteine, im Gegensatz zu den linearen Strukturen der WXG-100 Proteine.



**Abbildung 4.10: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex 75 10/300 GL**

Die Gelfiltrationssäule Superdex 75 10/300 GL wurde mittels des Gel Filtration Calibration Kits low molecular weight (GE Healthcare) nach Herstellerangaben geeicht. Es wurden 2 Läufe mit verschiedenen Kombinationen der fünf Eichproteine durchgeführt, wobei die angegebenen Werte die Mittelwerte der doppelt getesteten Proteine wiedergeben. Bei den Eichproteinen handelt es sich um Aprotinin (6,5 kDa), RibonukleaseA (13,7 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Conalbumin (75 kDa). Mittels Blue Dextran 2000 wurde das Totvolumen der Säule ( $V_0$  [ml]) von 8,91 ml bestimmt.

Die folgende Abbildung zeigt die Messung der  $OD_{280}$  während der Gelfiltration von EsxA und EsxB. Das Molekulargewicht kann anhand des Elutionspeaks mithilfe der Eichgerade bestimmt werden.

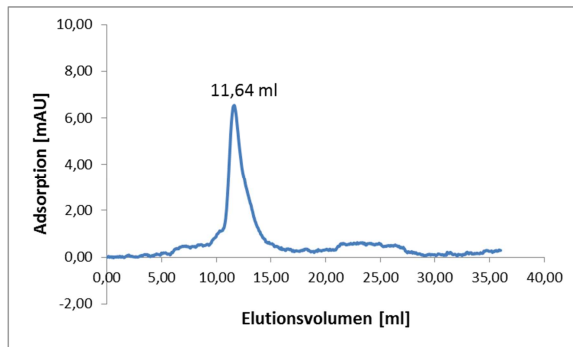


**Abbildung 4.11: Bestimmung des Molekulargewichtes von EsxA und EsxB in nativem Zustand mittels Gelfiltration**

200  $\mu$ l 300  $\mu$ g/ml His<sub>6</sub>EsxA (A) bzw. 600  $\mu$ g/ml His<sub>6</sub>EsxB (B) wurden mit einer Flussrate von 0,8 ml/min über eine Superdex 75 10/300 GL Gelfiltrationssäule aufgetrennt (3.31). Dabei wurde kontinuierlich die Adsorption bei OD<sub>280</sub> gemessen und gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.

His<sub>6</sub>EsxA weist bei der Elution lediglich ein Adsorptionsmaximum auf. Dies zeigt, dass das Protein nativ in einem Zustand vorliegt. Das Elutionsvolumen beträgt 11,75 ml, was einem Molekulargewicht von 40,8 kDa entspricht. Dieses Molekulargewicht korreliert weder mit dem eines Monomers, noch mit dem eines Dimers oder anderen Oligomers. Dies liefert einen deutlichen Hinweis auf eine nicht-globuläre Struktur von EsxA.

His<sub>6</sub>EsxB zeigt bei der Auftrennung über eine Gelfiltrationssäule zwei Adsorptionsmaxima, die 130,1 kDa ( $V_{el} = 9$  ml) und 31,7 kDa ( $V_{el} = 12,35$  ml) entsprechen. Da diese Daten in keinen Zusammenhang mit den Daten für EsxA zu bringen waren und aufgrund des relativ breiten Peaks, wurden die Fraktionen des Adsorptionsmaximums bei 12,35 ml erneut mittels Gelfiltration aufgetrennt. Hierfür wurde die doppelte Menge EsxB eingesetzt, um eine ausreichende Signalstärke im nachfolgenden Experiment zu erreichen. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der erneuten Auftrennung der Fraktionen des Adsorptionsmaximums von His<sub>6</sub>EsxB.



**Abbildung 4.12: Erneute Auftrennung der Fraktionen des Adsorptionsmaximums von His<sub>6</sub>EsxB mittels Gelfiltration**

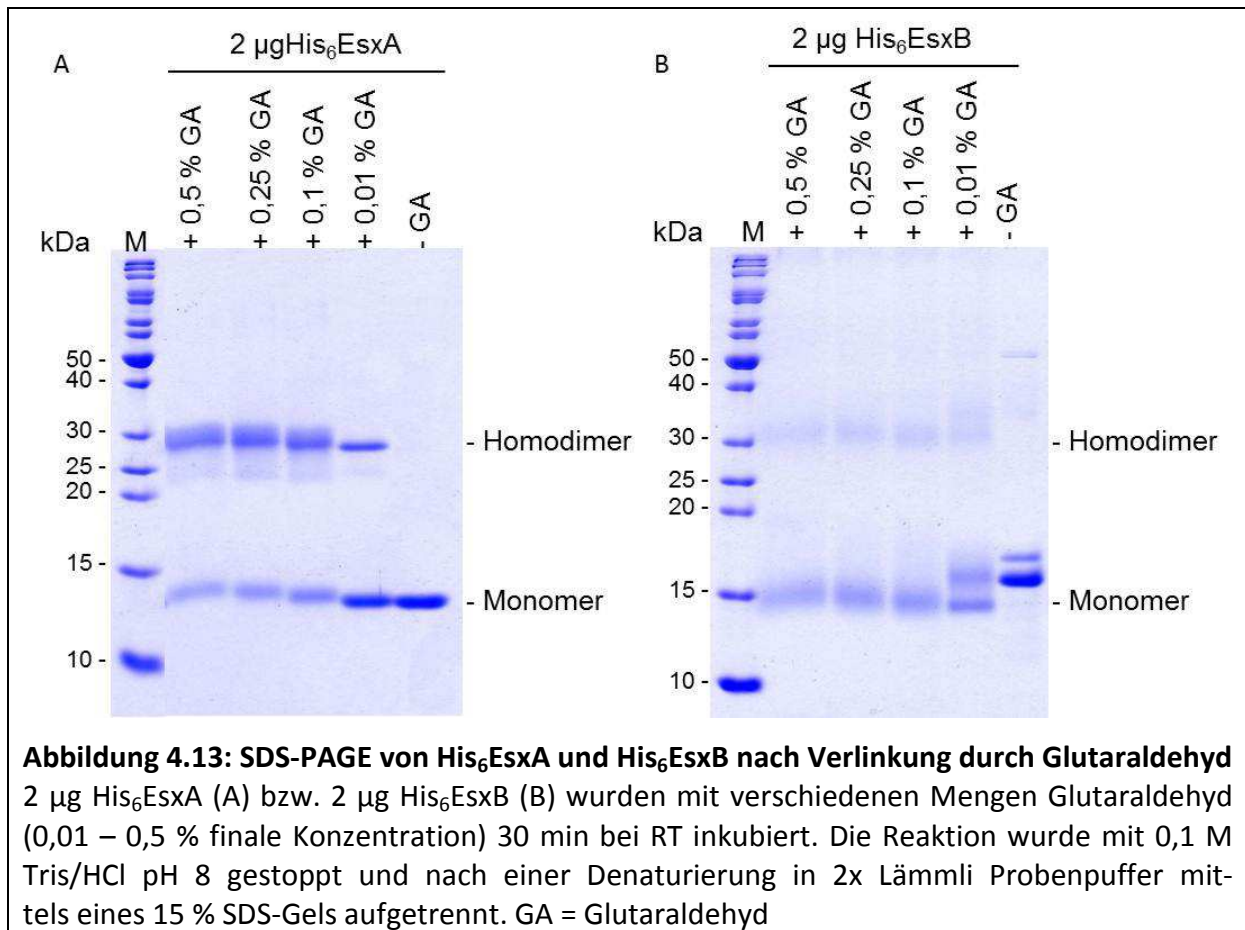
Die Elutionsfraktionen bei 12,13 und 12,38 ml aus Abbildung 4.11 B, die das Adsorptionsmaximum enthalten, wurden gemischt und erneut über eine Superdex 75 10/300 GL Gelfiltrationssäule aufgetrennt (3.31). Dabei wurde kontinuierlich die Adsorption bei OD<sub>280</sub> gemessen und gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.

Abbildung 4.12 zeigt, dass das breite Adsorptionsmaximum aus Abbildung 4.11 B wahrscheinlich aus mehreren Maxima besteht. Hauptsächlich handelt es sich um ein Maximum von 11,64 ml, was einem Molekulargewicht von 42,8 kDa entspricht. Dieses experimentell bestimmte Molekulargewicht entspricht aufgrund der wahrscheinlich linearen Struktur von EsxB nicht dem tatsächlichen Molekulargewicht. Allerdings kann es in Relation zu EsxA gebracht werden, das mit vorausgesagten 10,8 kDa etwas kleiner als EsxB mit 14,2 kDa ist (bzw. 12,2 und 15,6 kDa für His<sub>6</sub>EsxA und His<sub>6</sub>EsxB).

Die vermutlich lineare Struktur von EsxA und EsxB könnte das Spektrum in Richtung größerer Proteine verschieben, was auf das Vorliegen der beiden Proteine als Homodimere hinweist. Anhand dieser Experimente kann allerdings nicht bestimmt werden, ob EsxB in einer oder mehreren Formen vorkommt.

Handelt es sich bei EsxA und EsxB um Dimere, kann dies durch Crosslink-Versuche mit Glutaraldehyd gezeigt werden, da Glutaraldehyd Proteine, die sich in geringem Abstand zueinander befinden, kovalent über Aminogruppen von Aminosäuren verbindet.

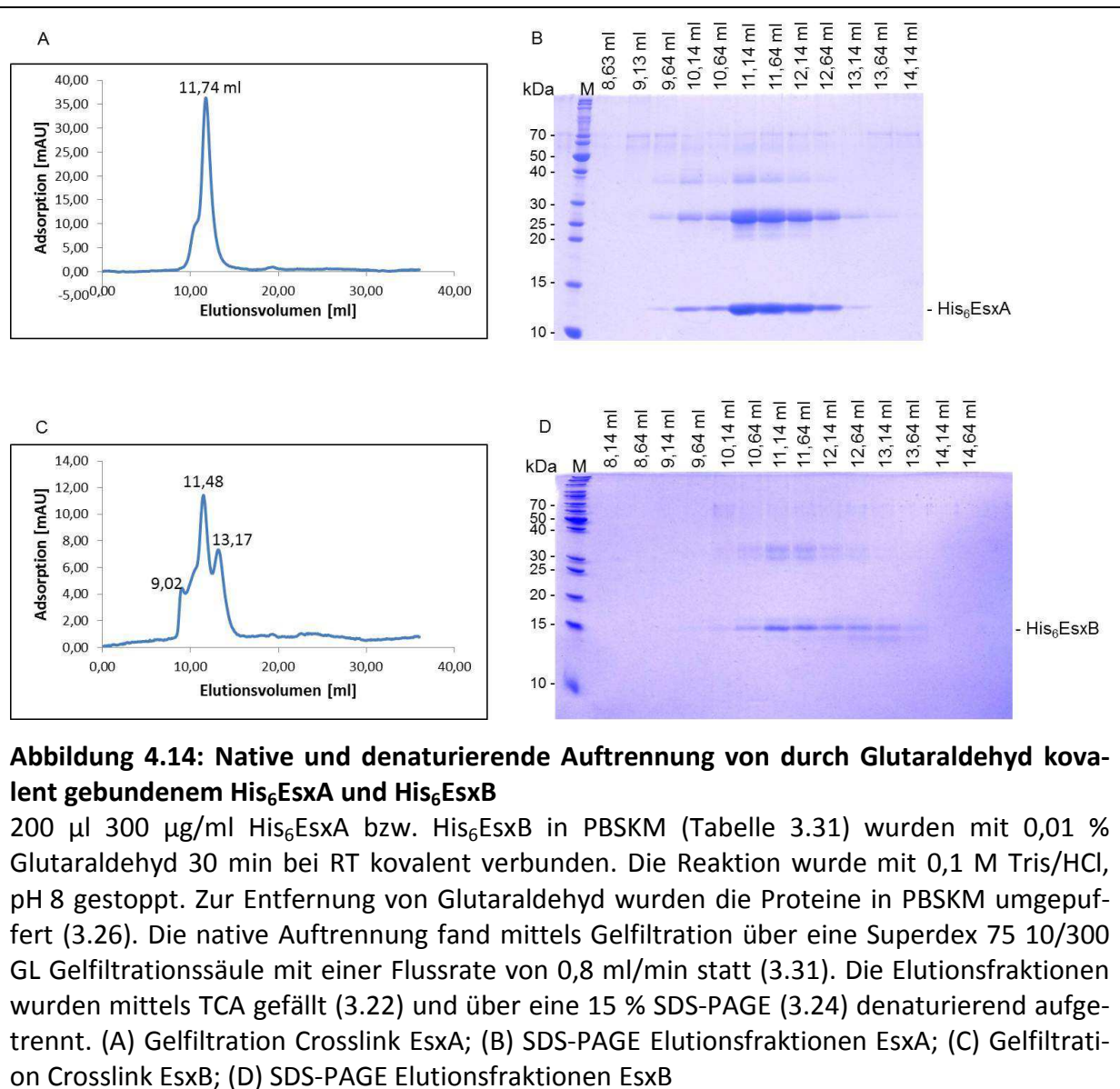
Dazu wurden sowohl EsxA als auch EsxB mit Glutaraldehyd behandelt und mittels eines Gelfiltrationsexperimentes analysiert. Die folgende Abbildung zeigt zunächst die denaturierende Auftrennung von His<sub>6</sub>EsxA und His<sub>6</sub>EsxB nach der kovalenten Verlinkung durch Glutaraldehyd.



Die Spuren, in denen die mit Glutaraldehyd behandelten Proteinproben aufgetrennt wurden, zeigen, dass Dimerbildung durch Crosslink mit Glutaraldehyd möglich ist. Im Fall von EsxB ist zu beobachten, dass die Anfärbung der Dimerbanden mittels Coomassie-Färbelösung schwierig ist. Die kovalent gebundenen Dimere treten spezifisch auf, d.h. es gibt keine weiteren Oligomerbanden, die auf eine unspezifische Verlinkung hinweisen. Ab einer finalen Konzentration von 0,1 % Glutaraldehyd tritt eine Sättigung auf, d.h. der Anteil an gebildetem Dimer im Verhältnis zu Monomer steigt nicht weiter an.

Die durch Glutaraldehyd verbundenen Proteine EsxA und EsxB wurden mittels Gelfiltration aufgetrennt. Treten bei diesen Experimenten keine neuen Adsorptionsmaxima auf, d.h. es ist weiterhin nur ein Peak detektierbar (vgl. Abbildung 4.11 und Abbildung 4.12), liegt EsxA nativ als Homodimer vor und EsxB zumindest teilweise. Sollten allerdings neue Adsorptionsmaxima auftreten, die dem doppelten Molekulargewicht (wie in Abbildung 4.11 und Abbildung 4.12 gemessen) entsprechen, liegen EsxA und EsxB nativ als Monomere vor.





Erzeugt man mittels Glutaraldehyd His<sub>6</sub>EsxA-Homodimere, so erscheint bei der Auftrennung durch Gelfiltration das gleiche Adsorptionsmaximum bei 11,74 ml wie bei der Auftrennung des unbehandelten Proteins (11,75 ml). Außer einer zusätzlichen Schulter am Anfang des Peaks sind keine Veränderungen zu beobachten; ein Adsorptionsmaximum, das auf das doppelte Molekulargewicht hindeutet, bleibt aus. Anhand der anschließenden denaturierenden Auftrennung (Abbildung 4.14 B) ist zu erkennen, dass es sich bei der Schulter um größere Proteinaggregate handelt, die vermutlich durch kovalente Bindung mehrerer Dimere entstanden sind. Trennt man das Adsorptionsmaximum denaturierend auf, zeigen sich hauptsächlich zwei Banden, die auf der Höhe des Monomers und des Homodimers laufen. Die Monomer-Bande entsteht durch nicht kovalent gebundenes Protein, das nativ als Homodi-

mer läuft, bei der SDS-PAGE allerdings zu Monomeren denaturiert wird. EsxA liegt also nativ in einer Form vor, bei der es sich um ein Homodimer handelt.

Ein anderes Bild ergibt sich bei der kovalenten Verlinkung von EsxB mittels Glutaraldehyd. Die native Auftrennung des verlinkten Proteins ergibt weiterhin ein Adsorptionsmaximum bei 11,48 ml (45,7 kDa), das laut der anschließend durchgeführten SDS-PAGE dem Homodimer entspricht. Allerdings treten zwei weitere Adsorptionsmaxima auf, wovon eines mit 13,17 ml einem Molekulargewicht von 22,4 kDa entspricht. Laut SDS-PAGE handelt es sich bei diesem Peak um das Protein in der Monomerform (s. Spur 13,14 ml, Abbildung 4.14 D). Warum dieses Maximum bei der Auftrennung des unbehandelten Proteins nicht detektierbar ist, bleibt unklar. Eventuell sind die beiden Maxima bei dieser Auftrennung zu einem breiten Peak verschmolzen. Der Proteingehalt der Elutionsfraktion des Adsorptionsmaximums bei 9,02 ml ist für eine Anfärbung mittels Coomassie zu gering bzw. schwer anzufärben. Allerdings ist zu vermuten, dass es sich hier ebenso wie bei EsxA um eine Aggregation handelt, da diese in den anderen Fraktionen mit höherer Proteinkonzentration ebenfalls sichtbar ist. Laut diesen Ergebnissen liegt EsxB nativ in mindestens zwei Formen vor, als Monomer und als Homodimer.

Auch bei diesem Experiment wird sichtbar, dass die Konzentrationsbestimmung der beiden Proteine Ungenauigkeiten der Messergebnisse der Experimente verursachte, bei denen bestimmte Mengen der beiden Proteine eingesetzt wurden. Laut durchgeführter Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop wurde von beiden Proteinen die gleiche Menge eingesetzt, die Signalintensität von EsxB liegt allerdings deutlich unter der von EsxA.

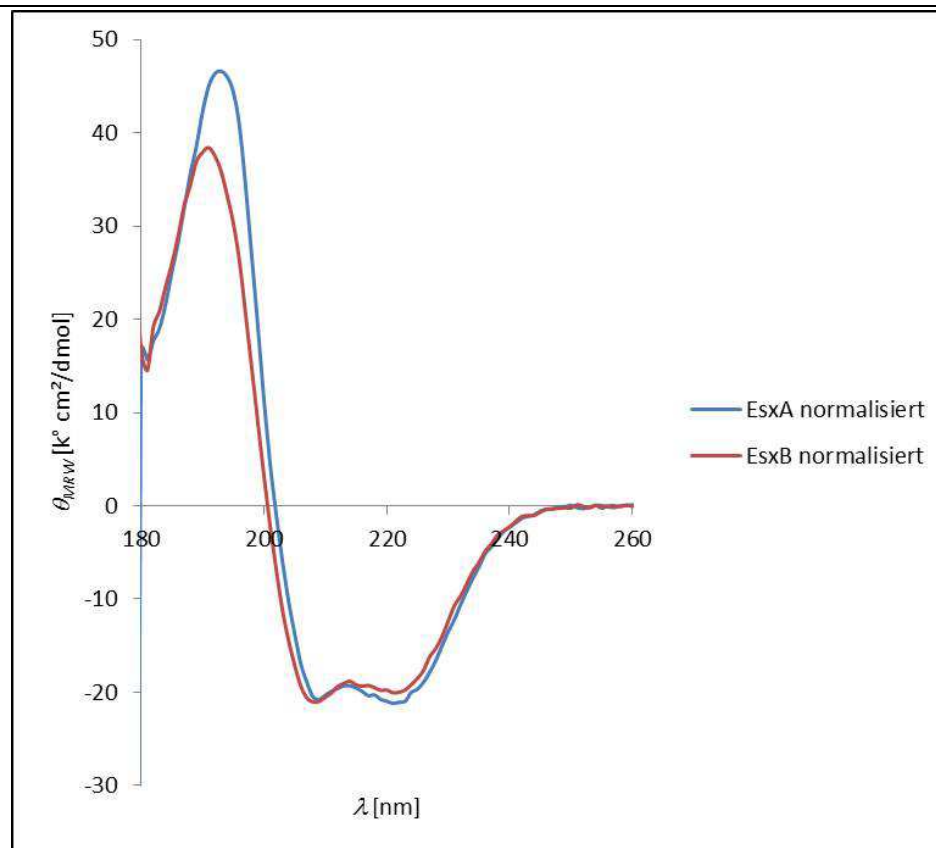
Ob EsxA und EsxB auch als Heterodimere vorliegen, konnte mithilfe dieser Methode nicht aufgeklärt werden, da EsxA und EsxB ein ähnliches Molekulargewicht besitzen. Wurden die beiden Proteine miteinander inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration aufgetrennt, war lediglich das Adsorptionsmaximum detektierbar, bei dem die beiden Homodimere laufen (Tabelle 4.2). Eine Aggregation von EsxA-Homodimeren mit EsxB-Homodimeren kann aber ausgeschlossen werden, da keine weiteren Adsorptionsmaxima zu beobachten waren.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gelfiltrationsexperimente

Protein	V <sub>el</sub> [mL]	M <sub>W</sub> [kDa]	M <sub>W</sub> theoretisch [kDa]
His <sub>6</sub> EsxA	11,75	40,8	12,22
His <sub>6</sub> EsxB (max)	11,64	42,8	15,56
His <sub>6</sub> EsxA crosslink	11,74	41,0	24,44
His <sub>6</sub> EsxB crosslink	9,02	129,1	
	11,48	45,7	31,12
	13,17	22,4	
His <sub>6</sub> EsxA + His <sub>6</sub> EsxB	11,90	38,3	27,78

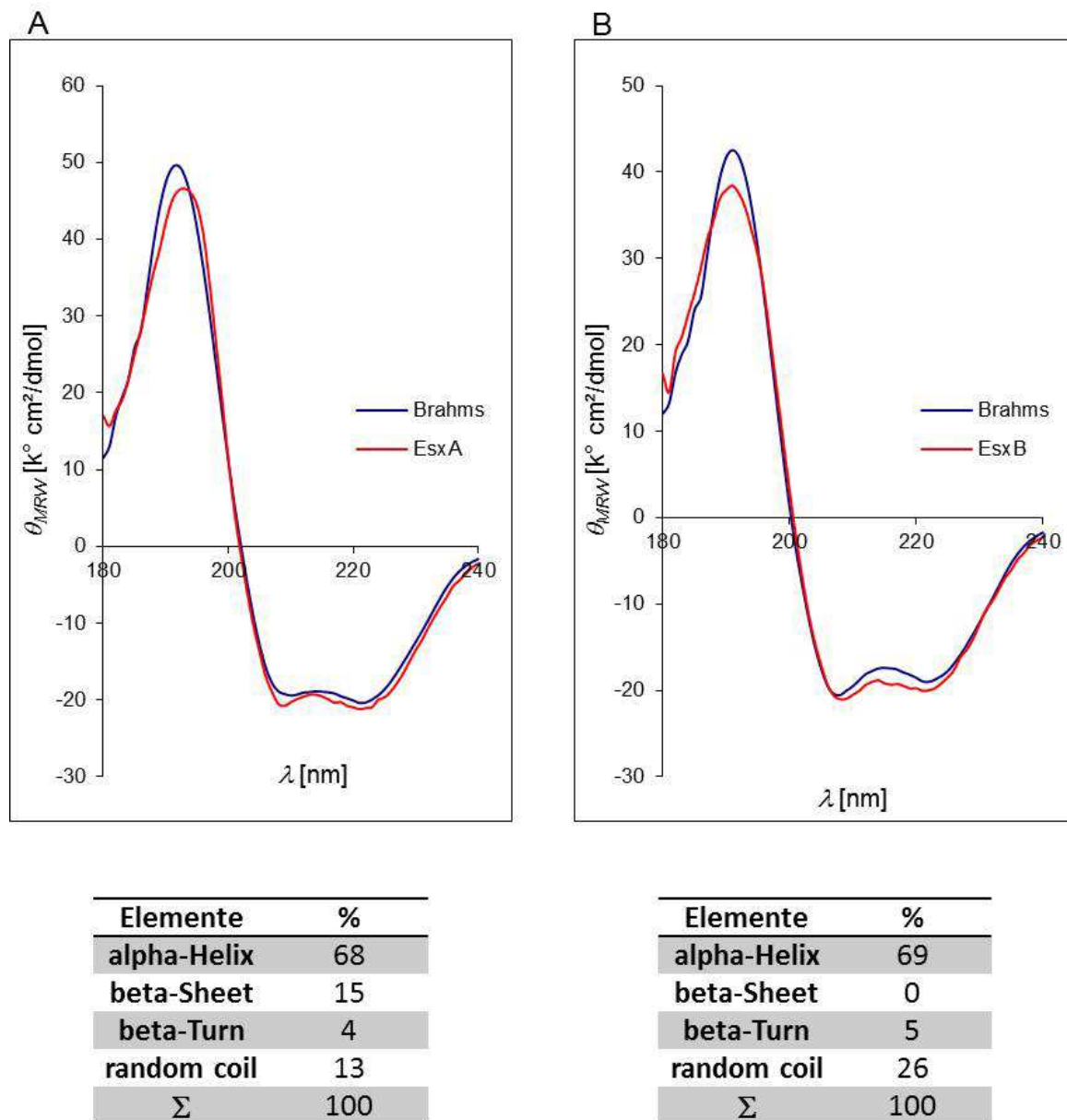
Die berechneten Molekulargewichte sind in der Spalte M<sub>W</sub> theoretisch angegeben. Für His<sub>6</sub>EsxB wurde der Wert aus Abbildung 4.12 verwendet, wo die Fraktionen des Adsorptionsmaximums der ursprünglichen Auftrennung des Proteins erneut aufgetrennt wurden.

Sekundärstrukturanalysen mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie klären, ob EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 die gleiche Struktur wie ihre Homologe von *S. aureus* aufweisen.



**Abbildung 4.15: Zirkulardichroismus-Spektrum von His<sub>6</sub>EsxA und His<sub>6</sub>EsxB aus *S. oralis* Uo5**  
 Das CD-Spektrum einer 10 µM Proteinlösung (His<sub>6</sub>EsxA und His<sub>6</sub>EsxB) wurde bei einer Betriebstemperatur von 20°C in einem Wellenlängenbereich von 260 – 175 nm in 1 nm-Schritten bei einer Bandbreite von 1 nm bestimmt (3.34). Um mögliche Fehler in der Konzentrationsbestimmung der Proteine auszugleichen, wurden die Spektren auf die Proteinkonzentration normalisiert.

Die Korrelation der Spektren von EsxA und EsxB lässt vermuten, dass die beiden Proteine eine sehr ähnliche Sekundärstruktur aufweisen. Die CD-Spektren geben die Form eines typischen  $\alpha$ -Helix-Proteins mit zwei negativen Maxima bei 222 nm und 208 nm sowie einem positiven Maximum bei 193 nm wieder (Holzwarth *et al.*, 1965). Zum Beweis dieser Vermutung wurde eine Strukturanalyse nach Brahms (Brahms *et al.*, 1980) durchgeführt, wobei ein dem gemessenen Spektrum möglichst ähnliches Spektrum aus Elementen der Referenzspektren für die einzelnen Strukturelemente generiert wird. Auf diese Weise lässt sich der Anteil der Strukturelemente bestimmen.



**Abbildung 4.16: Sekundärstrukturanalyse von EsxA und EsxB aus *S. oralis* Uo5 nach Brahms**  
Anhand der in Abbildung 4.15 dargestellten CD-Spektren von EsxA und EsxB wurde eine Sekundärstrukturanalyse nach Brahms durchgeführt. Die Tabellen geben die Anteile der einzelnen Strukturelemente an. (A) His<sub>6</sub>EsxA; (B) His<sub>6</sub>EsxB

Die Analyse ergab, dass sowohl EsxA als auch EsxB hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices bestehen (68 % und 69 %), was der Struktur von EsxA aus *S. aureus* entspricht. Bei EsxA wurden durch diese Analyse im Gegensatz zu EsxB 15 %  $\beta$ -Faltblätter nachgewiesen. Über die Lokalisation dieser innerhalb des Proteins kann lediglich mittels Kristallstrukturanalyse eine Aussage getroffen werden. Auch darüber, ob zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices vorliegen, kann nur eine Kristallstrukturanalyse Aufschluss geben. Die random coil Strukturelemente sind vermutlich zwi-

schen den beiden Helices, sofern diese in EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 vorkommen, und an den N- und C-terminalen Enden der Proteine lokalisiert.

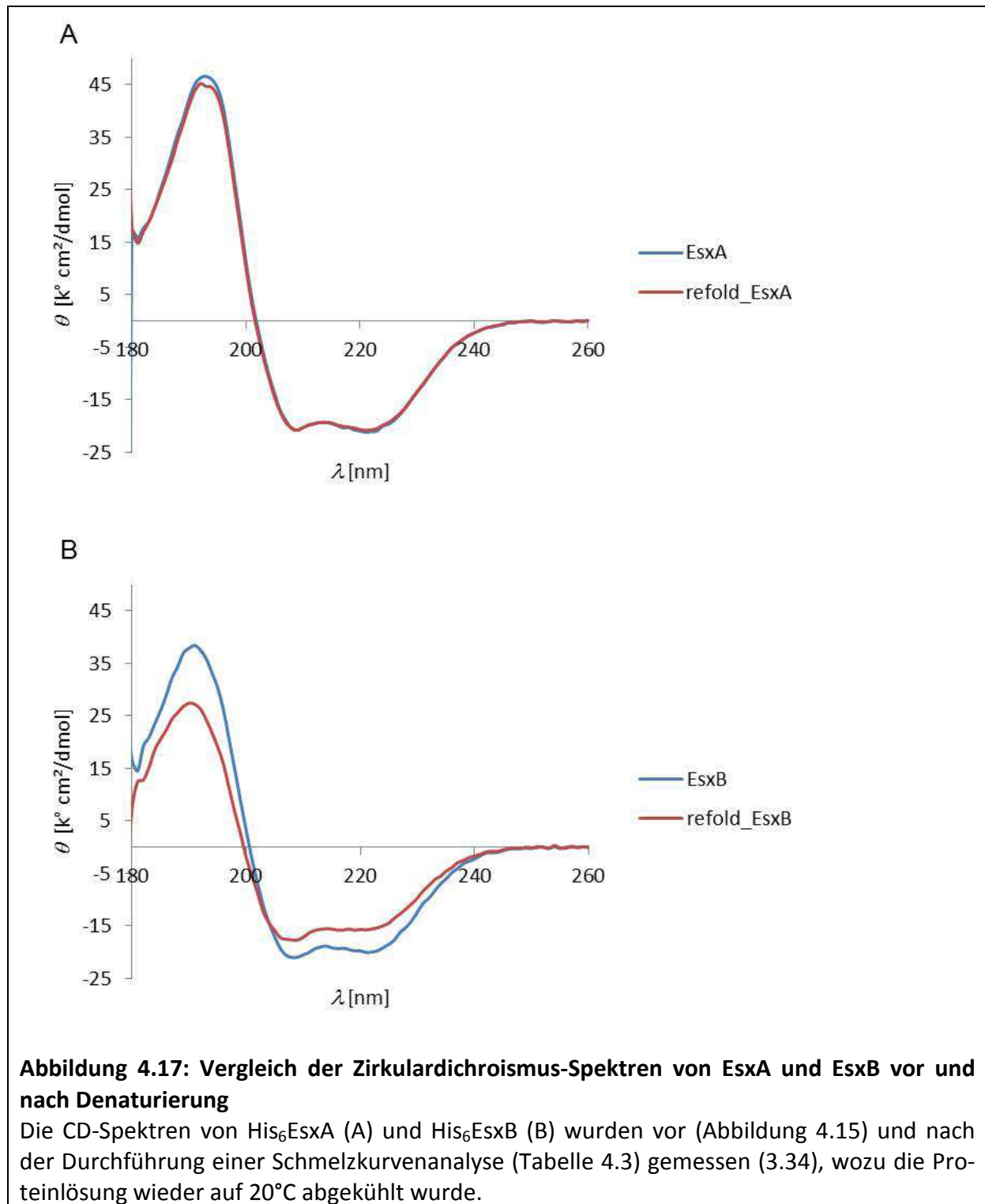
Die Stabilität der beiden WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 wurde mittels Schmelzkurvenanalyse bestimmt. Zusätzlich wurde nach der Denaturierung der Schmelzkurve und Abkühlen auf 20°C erneut ein CD-Spektrum aufgenommen. Durch den Vergleich der Spektren vor und nach der Schmelzkurvenanalyse kann ebenfalls eine Aussage über die Stabilität der Proteine getroffen werden, da sich hierbei zeigt, ob Proteine nach einer Denaturierung rückfaltbar sind.

Tabelle 4.3: Bestimmung des Schmelzpunktes von EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 mittels Schmelzkurvenanalyse

$\lambda$ [nm]	$T_m$ [°C] EsxA	$T_m$ [°C] EsxB
222	53,8	40,8
208	53,8	40,7
195	53,9	40,9
Mittelwert	53,8	40,8

Die Schmelzkurvenanalyse von His<sub>6</sub>EsxA und His<sub>6</sub>EsxB (3.34) erfolgte in einem Temperaturbereich von 20 – 94°C in 0,5°C-Schritten bei einer Heizrate von 1°C/min. Die Adsorption wurde bei 222, 208 und 195 nm für 4 s pro Wellenlänge bestimmt. Die Auswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Office 2010 (Excel), wobei die Schmelztemperatur dem Übergang vom nativen in den denaturierten Zustand entspricht (Wendepunkt sigmoide Kurve).

Die Schmelztemperatur von EsxA beträgt 53,8°C, die von EsxB 40,8°C, wobei die Messungen bei allen drei Wellenlängen sehr gut übereinstimmen. EsxA ist also überraschenderweise sehr viel stabiler als EsxB. Den Vergleich der CD-Spektren der beiden Proteine vor und nach der Schmelzkurvenanalyse gibt folgende Abbildung wieder.



Nach der Denaturierung zeigt EsxA ein sehr ähnliches CD-Spektrum wie vor der Denaturierung, was dafür spricht, dass EsxA ein außerordentlich stabiles Protein ist, das komplett renaturiert.

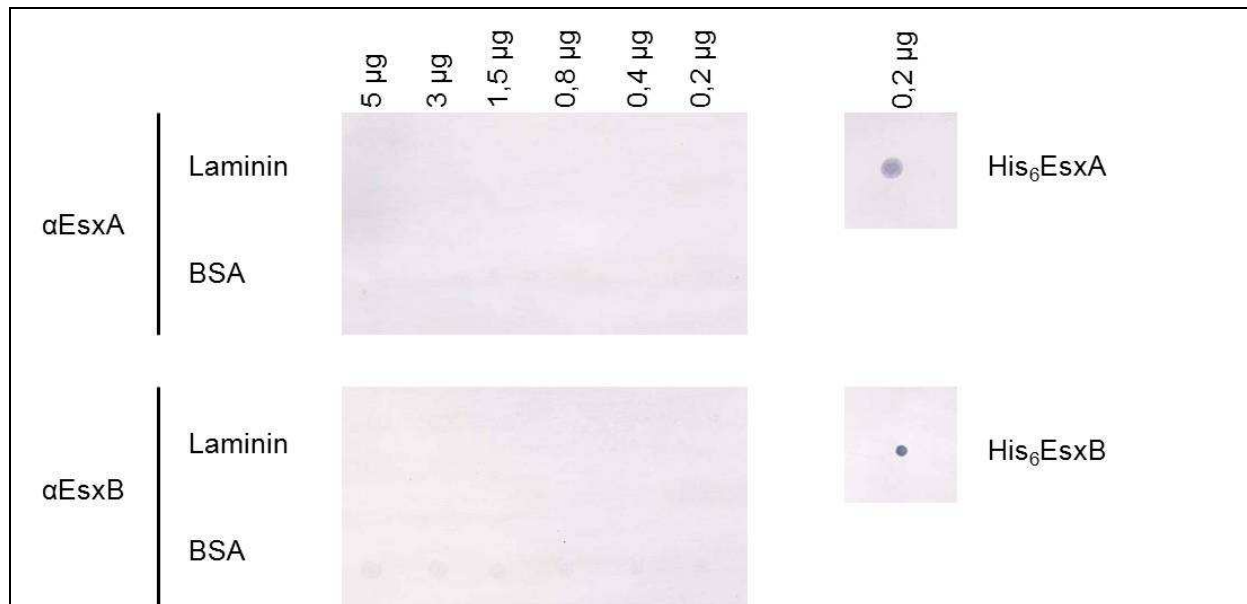
Das CD-Spektrum von EsxB hingegen hat nach der Denaturierung an Intensität verloren. Die Form des Spektrums ist allerdings ähnlich. Wäre eine große Menge des Proteins nicht rena-

turiert, hätte sich die Form des Spektrums verändert, da mehr random coil-Anteile vorhanden wären. Bleibt die Form allerdings gleich und lediglich die Intensität wird verringert, liefert dies einen Hinweis darauf, dass die Proteinkonzentration geringer ist, z.B. durch Ausfällen eines Teils der Proteinmenge.

#### 4.5.1 Bindung der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 an Laminin

Für das *M. tuberculosis* EsxA-Homolog ESAT-6 wurde beschrieben, dass es an Laminin bindet (Kinhikar *et al.*, 2010), ein Protein der Extrazellulärmatrix tierischer Zellen, und so die Bindung mit der Wirtszelle eingeht. Untersuchungen über eventuelle Bindungspartner der WXG-100 Proteine von *S. aureus* sind nicht beschrieben.

Mittels Dot Blot-Interaktionsstudien sollte untersucht werden, ob EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 ebenfalls mit Laminin interagieren.



**Abbildung 4.18: Dot Blot-Interaktionsstudien der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 mit Laminin**

0,2 – 5 µg Laminin oder BSA bzw. 0,2 µg His<sub>6</sub>EsxA und His<sub>6</sub>EsxB als Kontrolle wurden auf eine Nylonmembran aufgebracht. Nachdem unbesetzte Bindestellen geblockt worden waren, wurde die Membran mit dem zu testenden Protein inkubiert. Die Detektion erfolgte wie bei einem Western Blot (3.30) mit αEsxA F2 bzw. αEsxB M in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBST und αrabbit mit gekoppelter alkalischer Phosphatase als sekundärem Antikörper. Für die Farbreaktion wurde NBT/BCIP Stammlösung verwendet.



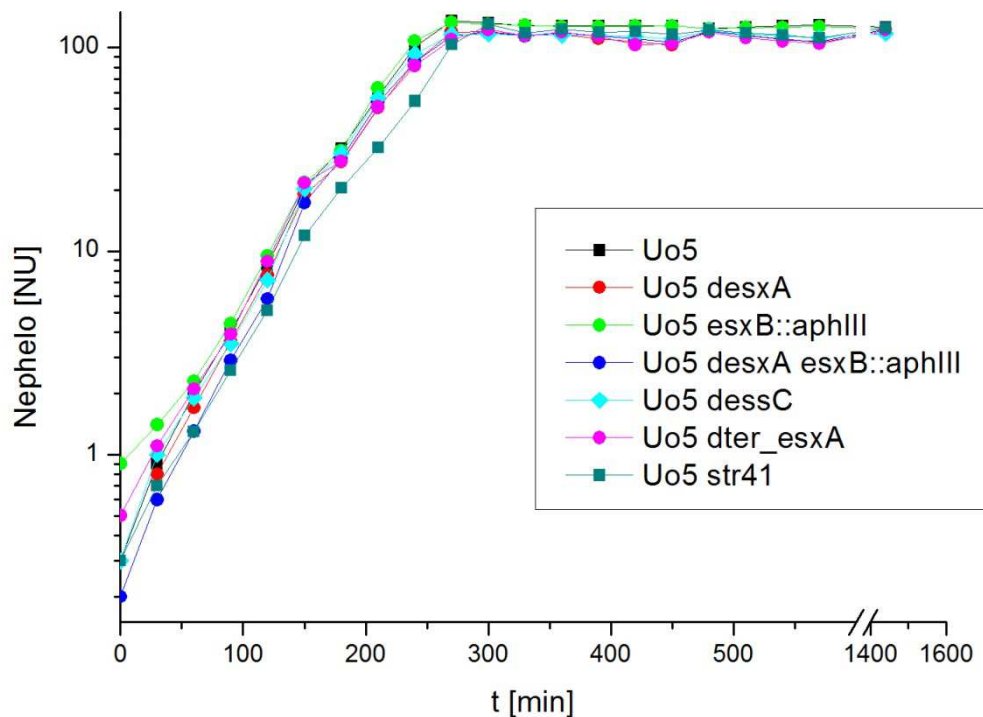
Mit dieser Methode konnte keine Bindung der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 an Laminin nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieses Kapitels, dass sowohl EsxA als auch EsxB von *S. oralis* Uo5 translatiert werden. Der Großteil der Proteine verbleibt im Cytoplasma, ein Teil wird jedoch wie bei *S. aureus* sekretiert. Die beiden WXG-100 Proteine bestehen hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices, was der Struktur von EsxA in *S. aureus* entspricht. Im Gegensatz zu EsxB liegt EsxA nativ nur als Dimer vor und ist mit einer Schmelztemperatur von 54°C sehr stabil. EsxB kommt wahrscheinlich in mehreren Formen vor und ist mit einer Schmelztemperatur von 41°C weniger stabil. Eine Bindung der beiden Proteine an Laminin konnte nicht nachgewiesen werden.

#### 4.6 Einfluss diverser Deletionen im ESX-1 Cluster von *S. oralis* Uo5 auf Wachstum und Morphologie

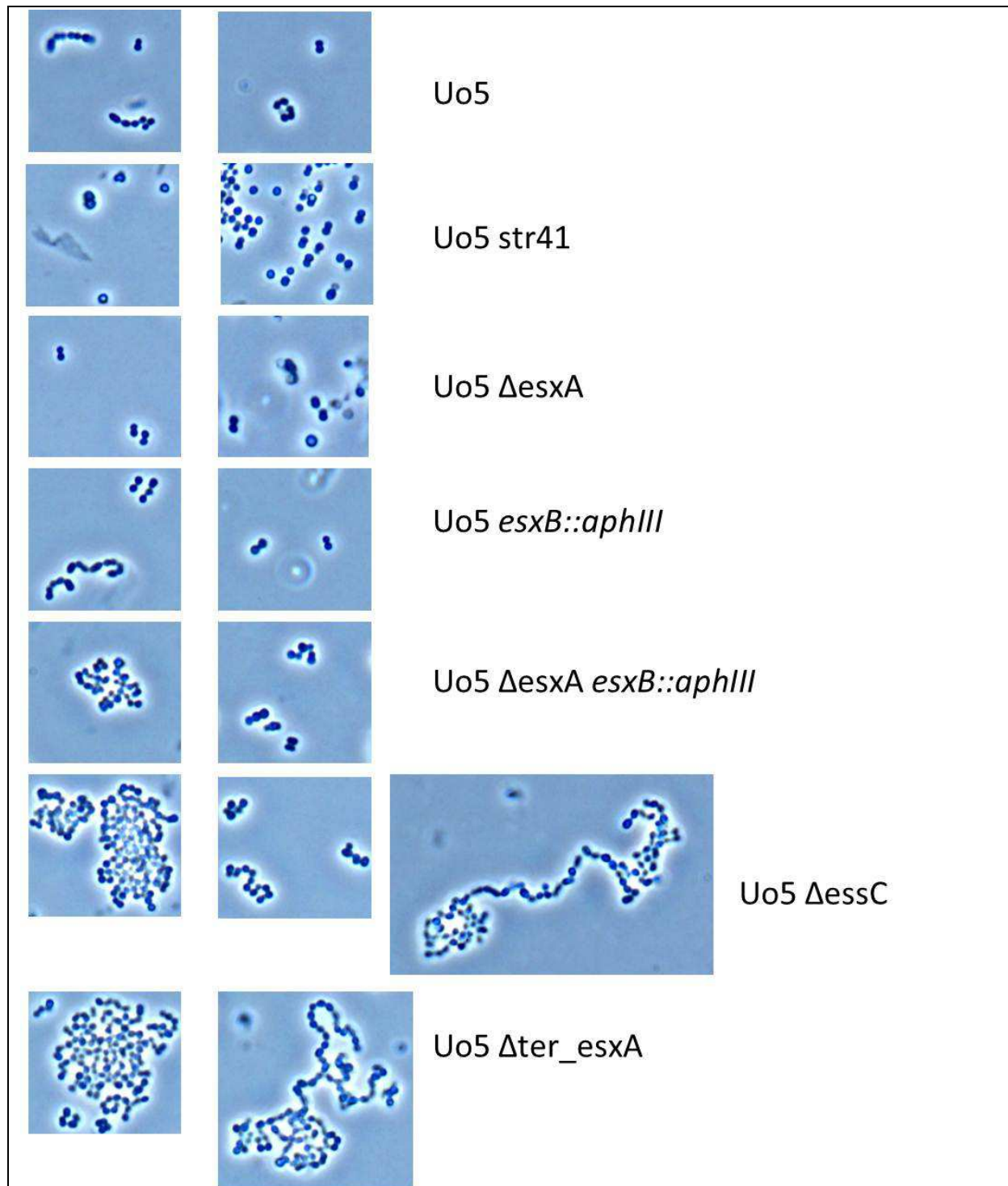
In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die hergestellten Deletionen im ESX-1 Cluster von *S. oralis* Uo5 einen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie haben. Hinweise darauf sind bisher aus der Literatur nicht bekannt, weder Wachstum noch Morphologie von ESX-1 Deletionsmutanten anderer Organismen wurden untersucht.

Zur Analyse des Wachstums und der Morphologie der in dieser Arbeit hergestellten Deletionsderivate und deren Ausgangsstämme wurden Wachstumskurven (3.6.1) in CpH8-Medium (3.5.1) erstellt und bei einer Zelldichte von  $N = 70$  mikroskopische Analysen der Stämme durchgeführt.



**Abbildung 4.19: Auswirkung diverser ESX-1 Deletionen auf das Wachstum von *S. oralis* Uo5**  
 Verschiedene Deletionsmutanten in ESX-1 von *S. oralis* Uo5 und deren Ausgangsstämme wurden 10 %ig aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur in CpH8-Medium angeimpft. Das Wachstum wurde nephelometrisch in Abständen von 30 min verfolgt.

Die verschiedenen ESX-1 Deletionsderivate von *S. oralis* Uo5 unterscheiden sich nicht im Wachstum vom Wildtyp Uo5. Die Wiederholung der Analyse bestätigte das Ergebnis. Alle Stämme wachsen mit einer Generationszeit von ca. 33 min. Die Deletionen von *esxA*, *esxB*, *essC*, des Terminators zwischen *esxA* und *esxA* sowie die Doppeldeletion von *esxA* und *esxB* führen also zu keinen Wachstumsdefiziten.



**Abbildung 4.20: Auswirkung diverser ESX-1 Deletionen auf die Morphologie von *S. oralis* Uo5**

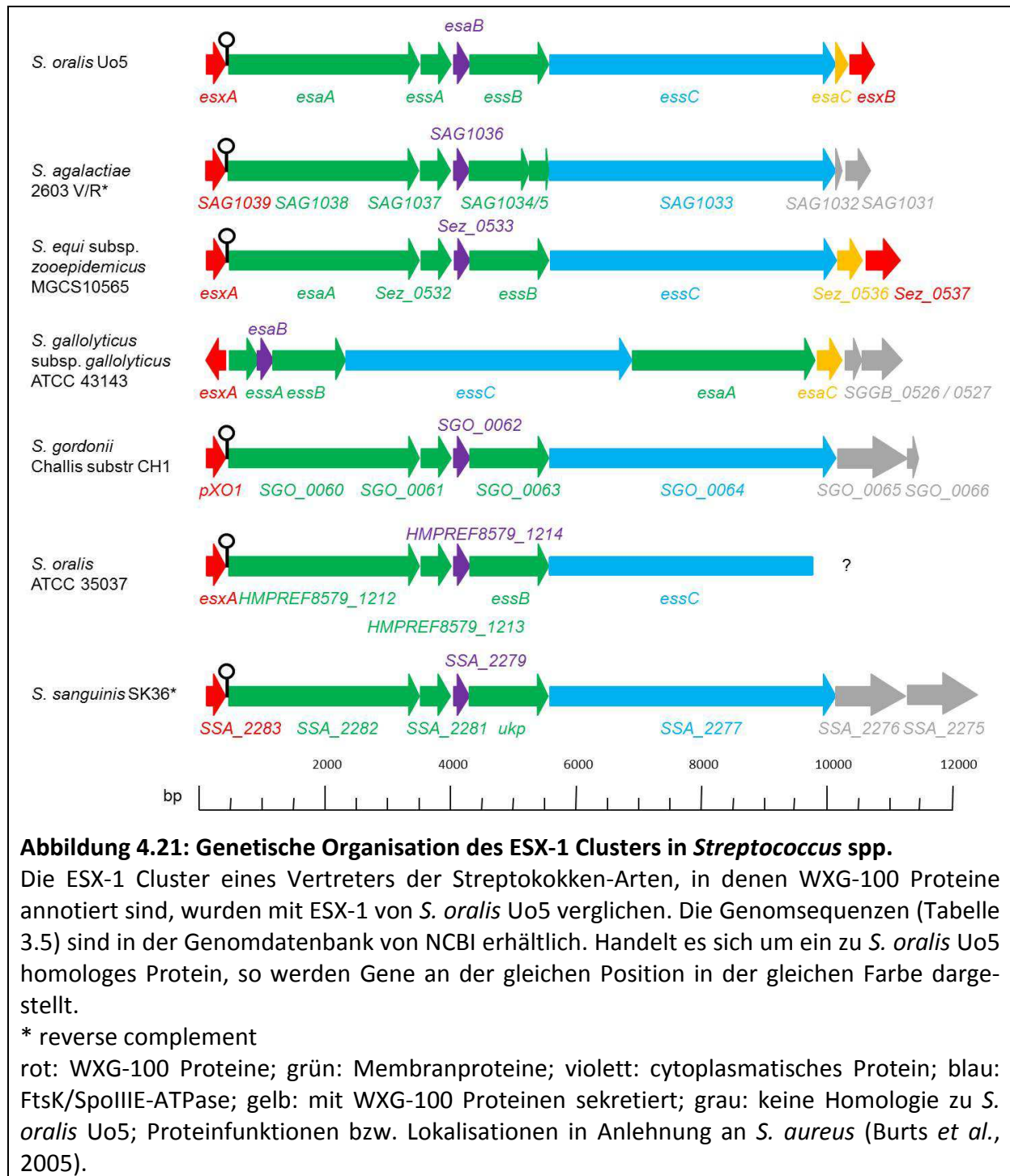
Die in dieser Abbildung gezeigten Stämme wurden in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von  $N = 70$  angezogen. Von dieser Kultur wurden 10  $\mu$ l entnommen und auf einem Objektträger mikroskopisch bei 100facher Vergrößerung untersucht.

Im Gegensatz zum Wachstum haben Veränderungen im ESX-1 Cluster von *S. oralis* Uo5 durchaus Auswirkungen auf die Zellmorphologie. Dabei treten die gravierendsten Veränderungen bei einer Deletion des Transporters (*essC*) und bei einer Deletion des Terminators zwischen *esxA* und *esxA* auf. Der Wildtyp Uo5 und auch Uo5 str41, der Ausgangsstamm von Uo5  $\Delta$ essC bzw. Uo5  $\Delta$ ter\_*esxA*, wachsen als Diplokokken bzw. kurze Ketten, wohingegen die beiden genannten Deletionsstämme sehr lange Ketten bzw. Zellhaufen bilden. Die Stämme mit Einzeldelationen von *esxA* bzw. *esxB* wachsen dagegen wie ihre Ausgangsstämme (Uo5 str41 bzw. Uo5). Die Bildung kleiner Zellklumpen, die allerdings sehr viel weniger Zellen beinhalten als beispielsweise bei Uo5  $\Delta$ ter\_*esxA*, ist ansatzweise auch im Doppeldeletionsderivat Uo5  $\Delta$ esxA *esxB::aphIII* zu beobachten.

## 4.7 Das ESX-1 Sekretionscluster in *Streptococcus* spp.

### 4.7.1 Verbreitung und Aufbau des ESX-1 Clusters in *Streptococcus* spp.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war die Proteinfamilie der WXG-100 Proteine (PF06013, Sanger Wellcome Trust) in Genomen von insgesamt 16 Streptokokken-Stämmen annotiert, darunter Vertreter der Spezies *S. agalactiae*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. equi* und *S. oralis* (Abbildung 2.5). Nach neusten Erkenntnissen sind WXG-100 Proteine auch in *S. gallolyticus* vorhanden. Diese Spezies gehören zur Gruppe der Viridans-Streptokokken, doch besitzen längst nicht alle Vertreter dieser Gruppe WXG-100 Proteine, z.B. *S. pneumoniae*. Ein Vergleich der genetischen Anordnung ist in Abbildung 4.21 zu sehen. Für einen Homologievergleich wurden die Genome eines Vertreters jeder Spezies (Tabelle 3.5) einer bioinformatischen Analyse unterzogen, bei der die Gene der Region, in der ein WXG-100 Protein annotiert ist, mit den korrelierenden Genen von *S. oralis* Uo5 verglichen wurden (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> für Blast, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> für Alignments).



In den Stämmen *S. agalactiae* 2603 V/R und *S. sanguinis* SK36 befand sich das ESX-1 Cluster auf dem Gegenstrang, zur Übersicht wurden die Sequenzen für Abbildung 4.21 reverse complement verwendet. In keinem der Stämme befindet sich das ESX-1 Cluster in der gleichen genomischen Umgebung wie bei einem der anderen Stämme.

Eine große Identität ist bei den ersten sechs der acht Gene (von *esxA* bis *essC*) zu beobachten. Alle untersuchten Stämme besitzen ein *esxA*-Homolog, Homologe der drei Gene, die für

Membranproteine kodieren (*esaA*, *essA*, *essB*) sowie ein *esaB*-Homolog. Außerdem ist in allen Stämmen das Gen der FtsK/SpoIIIE-ATPase *EssC* vorhanden. Bei *S. agalactiae* 2603 V/R sind an der Stelle von *essB* zwei getrennte Gene im gleichen Frame annotiert, deren Größe addiert der Größe von *essB* in *S. oralis* Uo5 entspricht und die als zusammenhängende Sequenz zu diesem homolog sind. Ob es sich hierbei um einen Sequenzierfehler oder tatsächlich um zwei separate Gene handelt, ist nicht bekannt.

Die Genomsequenz von *S. oralis* ATCC 35037 ist bisher lediglich als Shotgun-Sequence in einzelnen Contigs erhältlich. Das Contig, in dem sich ESX-1 befindet, endet kurz vor Ende der *essC*-Sequenz, bis wohin eine Homologie zu *S. oralis* Uo5 besteht. In keinem der restlichen Contigs konnte eine Homologie zu *esaC* bzw. *esxB* gefunden werden.

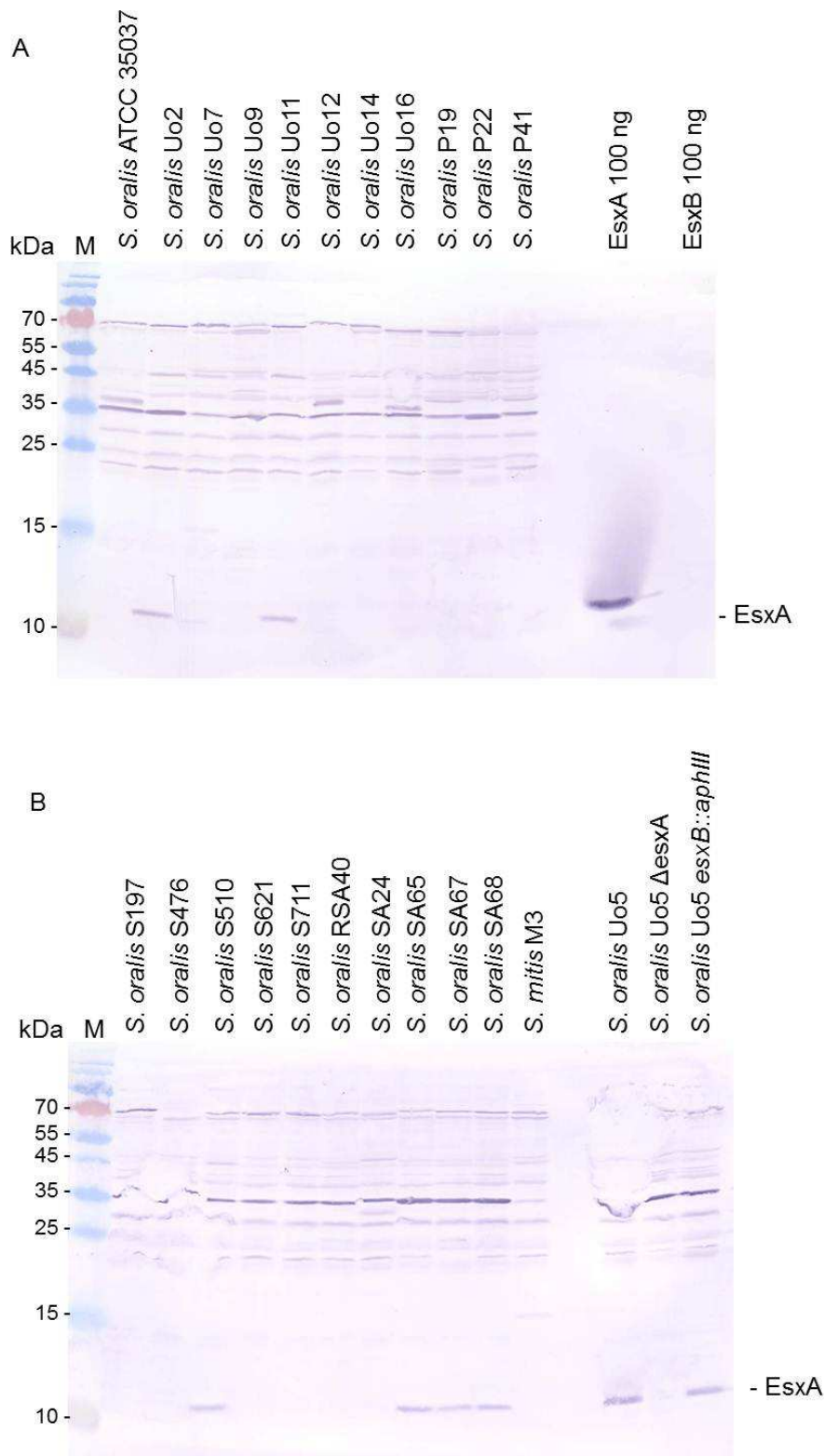
Eine Ausnahme bildet *S. gallolyticus*, der zwar die ersten sieben Gene (*esxA* – *esaC*) besitzt (*esxB* fehlt), allerdings in einer anderen Anordnung. Außerdem wird *esxA* auf dem Gegenstrang kodiert, weswegen kein Terminator am 3'-Ende dieses Gens zu finden ist.

Die Sequenz downstream von *essC* scheint kaum konserviert zu sein. Bei *S. aureus* sowie auch bei *S. oralis* Uo5 ist hier das Gen des zweiten WXG-100 Proteins *EsxB* und *esaC* lokalisiert. Lediglich bei *S. equi* subsp. *zooepidemicus* MGCS10565 und *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 wurde *esaC* durch Blast nachgewiesen, allerdings handelt es sich hier um eine geringe Sequenzübereinstimmung und die Größe stimmt nicht mit der von *esaC* in *S. oralis* Uo5 überein. Auch die Proteineigenschaften scheinen verschieden zu sein. *Sez\_0537* ist zwar ebenfalls ein WXG-100 Protein, besitzt aber keine Sequenz-Homologie zu *esxB* von *S. oralis* Uo5. In allen anderen Stämmen waren weder ein *esaC*- noch ein *esxB*-Homolog nachweisbar.

Das ESX-1 Sekretionscluster ist also in den Spezies *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. gordonii*, *S. oralis* und *S. sanguinis* innerhalb der ersten sechs Gene konserviert. Die beiden letzten Gene, *esaC* und *esxB* wurden lediglich in *S. oralis* Uo5 und *S. equi* identifiziert. Handelt es sich bei *S. oralis* Uo5 um eine der wenigen Ausnahmen, die noch das vollständige ESX-1 Sekretionscluster wie *S. aureus* besitzt? Umso interessanter wäre die Analyse der *S. oralis* ATCC 35037-Sequenz an dieser Stelle.

#### 4.7.2 Das ESX-1 Sekretionscluster in diversen *S. oralis*-Stämmen

Im vorhergehenden Kapitel wurde der Aufbau des ESX-1 Clusters in verschiedenen Streptokokken-Spezies bioinformatisch analysiert. Dabei war diese Analyse im einzigen *S. oralis* außer Uo5, dessen Genomsequenz öffentlich zugänglich ist, nur teilweise möglich, da Sequenzdaten des 3'-Endes nur für den Stamm Uo5 vorhanden sind. Die umfangreiche Stammsammlung unserer Abteilung enthält einige klinische *S. oralis*-Stämme aus verschiedenen Ländern (Uo = Ungarn, P = Frankreich (Paris), S = Spanien, SA = Südafrika), die mithilfe der in Kapitel 3.29 beschriebenen Antiseren auf das Vorhandensein der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB untersucht werden sollten. Dazu wurden die Stämme in CpH8-Medium (3.5.1) angezogen, Zelllysate hergestellt (3.23) und der Zellüberstand gefällt (3.22). Die Proteine dieser Proben wurden mittels SDS-PAGE (3.24) aufgetrennt und Western Blots mit EsxA- bzw. EsxB-Antiseren durchgeführt (3.30).



**Abbildung 4.22: Nachweis von EsxA in klinischen *S. oralis*-Zelllysaten durch Immunoblot**

Über 15 % SDS-Gele wurden Zelllysate der Stämme aufgetrennt, wobei die aufgetragene Menge 1 ml Kultur N = 20 entspricht. Die Immunoblotanalyse erfolgte mittels  $\alpha$ EsxA F2 (1:10.000) als primärem und  $\alpha$ rabbit mit gekoppelter alkalischer Phosphatase als sekundärem Antikörper. Die Detektion fand mit NBT/BCIP Stammlösung statt.



EsxA konnte immunologisch in sechs von 23 klinischen *S. oralis*-Zelllysaten nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die Stämme *S. oralis* Uo2, Uo11, S510 und die drei südafrikanischen Isolate SA65, SA67 und SA68. Die Kontrollstämme *S. oralis* Uo5 und Uo5 *esxB::aphIII* zeigten ebenfalls ein EsxA-Signal.

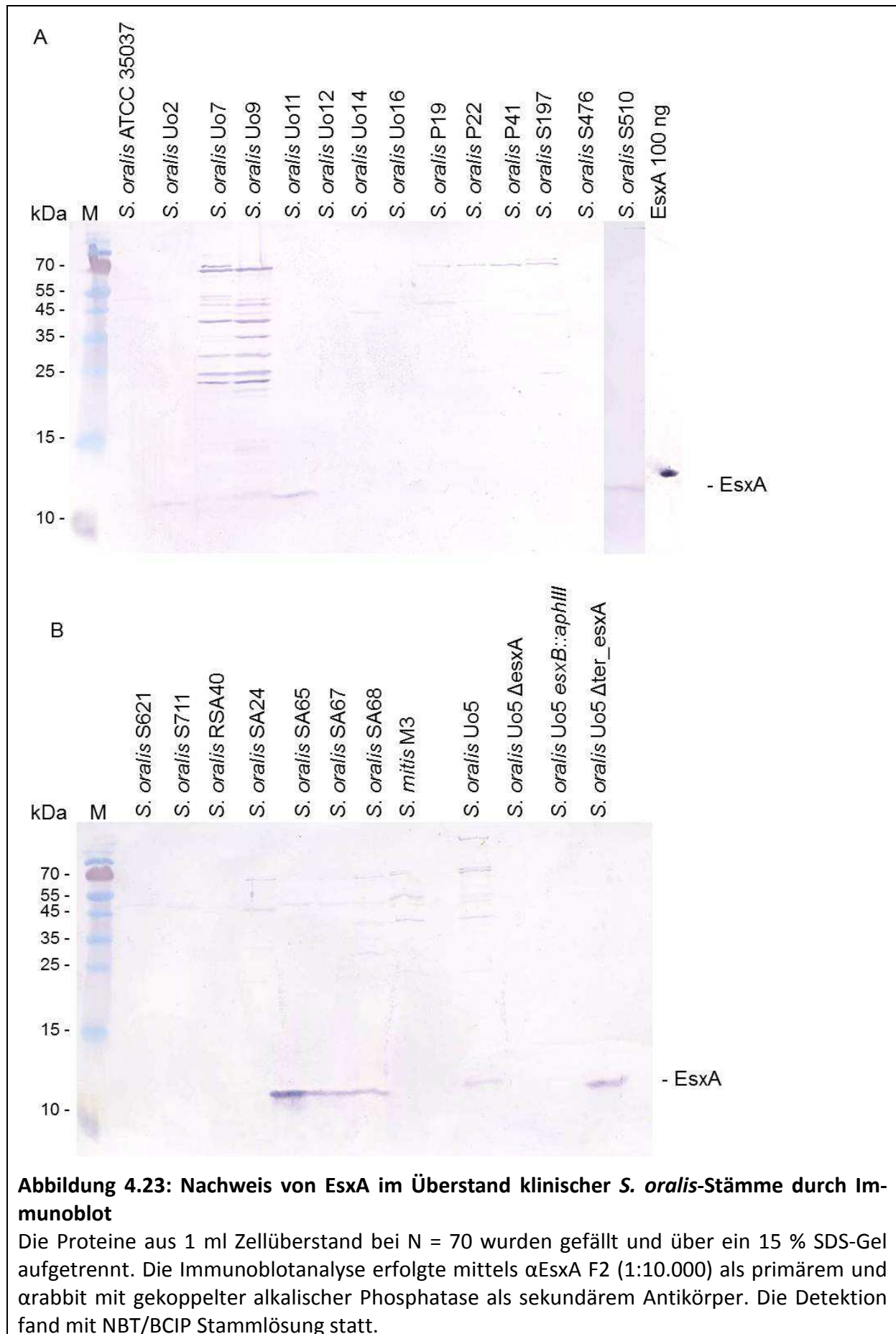
Das gleiche Bild ergibt sich, wenn die Proteine des Zellüberstands dieser Stämme mittels Western Blot untersucht werden (Abbildung 4.23). Das verstärkte EsxA-Signal von *S. oralis* SA65 war nicht reproduzierbar und stellt in seiner Stärke somit ein Artefakt dar.

Durch MLST-Analysen wird der Stamm M3 *S. mitis* zugeordnet (Chi *et al.*, 2007). In keinem der bisher veröffentlichten *S. mitis*-Genome ist ein ESX-1 Locus vorhanden. In der unveröffentlichten Genomsequenz von *S. mitis* M3, die in unserer Abteilung als Shotgun-Sequenz vorliegt, wurden allerdings Sequenzabschnitte identifiziert, die homolog zu Teilen des ESX-1 Clusters von *S. oralis* Uo5 sind. Beispielsweise enthält diese Region ein Gen, das homolog zu *esxA* von *S. oralis* Uo5 ist. Allerdings war eine Detektion mit dem Antiserum gegen EsxA von *S. oralis* Uo5 nicht möglich.

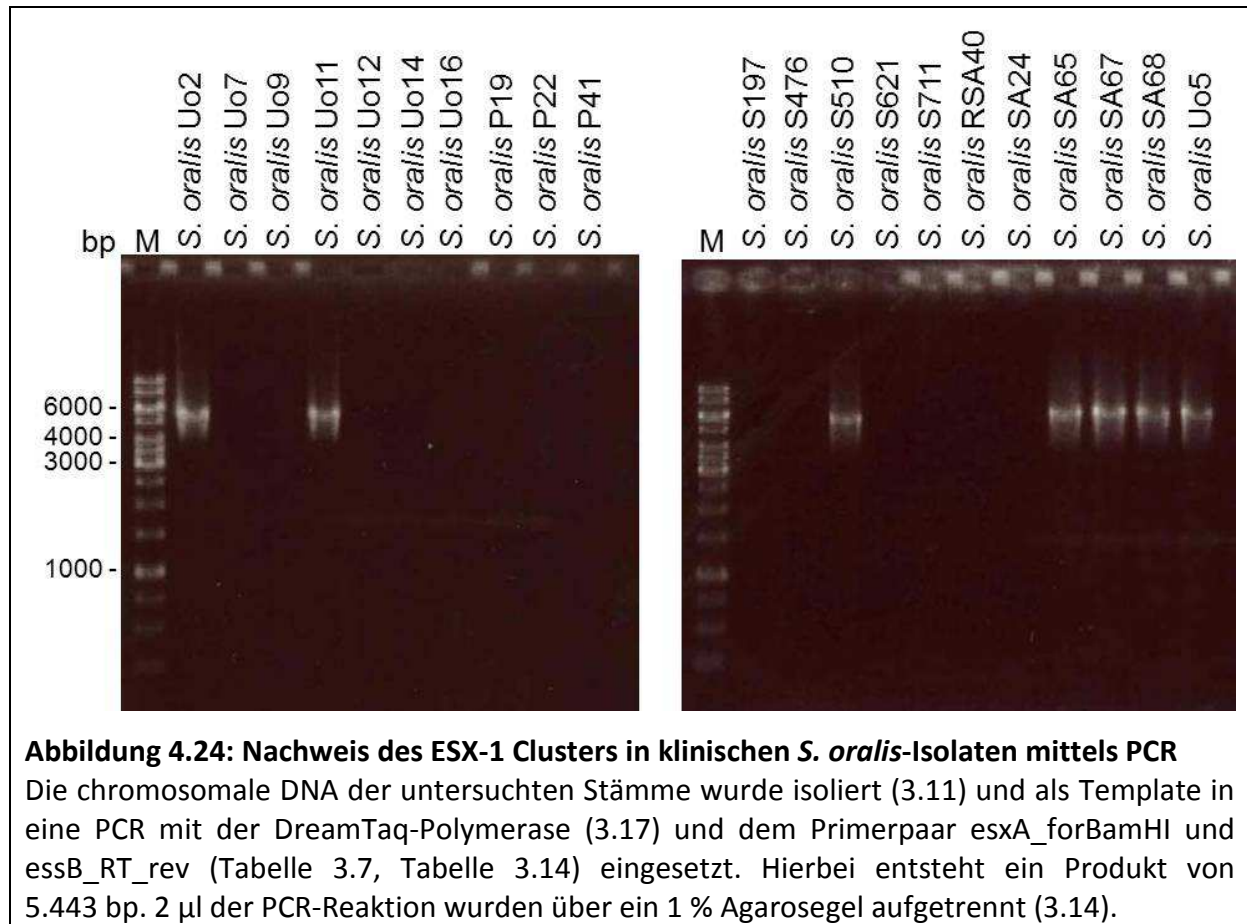
EsxA konnte also neben *S. oralis* Uo5 in zwei ungarischen, einem spanischen und drei südafrikanischen Isolaten im Zelllysate sowie im Zellüberstand nachgewiesen werden.

Die Detektion von EsxB mithilfe des in Kapitel 3.29 beschriebenen Antiserums war in den klinischen *S. oralis*-Stämmen hingegen nicht möglich. Das Antiserum zeigte sowohl bei Immunoblots mit Zelllysaten als auch mit gefälltem Zellüberstand entweder keine Signale auf der Laufhöhe von EsxB oder starke unspezifische Reaktionen, die den Nachweis von Proteinen dieser Größe unmöglich machten.

Ob nun die Stämme, bei denen EsxA oder EsxB nicht nachweisbar waren, diese Proteine nicht exprimieren bzw. die Gene nicht vorhanden sind, oder ob die Proteine nicht ausreichend homolog zu denen von *S. oralis* Uo5 sind, sodass das Antiserum diese nicht erkennt, bleibt unklar, da die DNA-Sequenz dieser Stämme nicht verfügbar ist. Im Fall von *S. mitis* M3 besteht lediglich eine Identität von 32 % zu EsxA von *S. oralis* Uo5.



Zusätzlich zu dem Nachweis der Proteine wurden PCR-Reaktionen mit chromosomaler DNA der oben untersuchten klinischen Isolate unter Verwendung diverser Primerkombinationen durchgeführt.



Wurden die Primerpaare *esxAfor\_BamHI* und *esxB\_Sall* (Tabelle 3.7) verwendet, wurde lediglich ein Produkt beim Kontrollstamm *S. oralis* Uo5 amplifiziert. Wurde die PCR allerdings mit den Primerpaaren *esxA\_forBamHI* und *essB\_RT\_rev* (Tabelle 3.14, 5.443 bp) bzw. *esxA\_forBamHI* und *esaA\_RT\_rev*, 3.382 bp) durchgeführt, entstand bei allen Stämmen ein Produkt, bei denen auch EsxA durch einen Immunoblot nachgewiesen wurde. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Immunoblots und der PCR zusammen.

Tabelle 4.4: Nachweis des ESX-1 Clusters in klinischen *S. oralis*-Isolaten

+	-
Uo2	ATCC 35037
Uo11	Uo7
S510	Uo9
SA65	Uo12
SA67	Uo14
SA68	Uo16
Uo5	P19
	P22
	P41
	P42
	S197
	S476
	S621
	S711
	RSA40
	SA24
	M3

+ Nachweis von EsxA in Zelllysate und Kulturmedium durch Western Blot und Nachweis durch PCR-Reaktion; - keine Signale bei Western Blot Analyse und keine PCR-Produkte

Die Ergebnisse der Immunoblots und der PCR korrelieren in allen Fällen. EsxA konnte durch Immunoblots in sechs Stämmen nachgewiesen werden, in denen auch die PCR mit *esxA\_forBamHI* und *essB\_RT\_rev* Produkte lieferte. Die Möglichkeit, dass die restlichen Stämme ebenfalls das ESX-1 Cluster bzw. Komponenten davon besitzen, kann nicht ausgeschlossen werden, da Primer im Falle einer stark veränderten DNA-Sequenz nicht binden bzw. der Antikörper nicht hybridisieren kann. Außerdem kann keine Aussage über die Vollständigkeit von ESX-1 bzw. das Vorhandensein von *esxB* bzw. EsxB in den Stämmen gemacht werden, die bei den oben genannten Untersuchungen Signale bzw. PCR-Produkte lieferten, da in diesem Fall die Detektion mittels des entsprechenden Antiserums durch Immunoblot nicht möglich war und die PCR mit einem Primer in *esxB* keine Produkte lieferte.

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das ESX-1 Sekretionscluster von *S. oralis* Uo5 funktionsfähig ist. Die Transkriptionsdaten bestätigen außerdem die Funktionalität des Streptokokken-spezifischen Terminators zwischen *esxA* und *esaA*. Die beiden WXG-100 Proteine EsxA und EsxB konnten sowohl im Zelllysate als auch im Zellüberstand nachgewiesen werden. Mithilfe proteinbiochemischer und biophysikalischer Experimente konnte gezeigt werden, dass EsxA nativ als Homodimer vorliegt, EsxB nimmt diese Form zumindest teilweise ein, wobei die beiden Proteine hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices bestehen. Keine Sekretion der WXG-100 Proteine bei einer Deletion des Gens, das für die FtsK/SpoIIIE-ATPase kodiert, bestätigte, dass dieses Protein in *S. oralis* ebenfalls für den Export von EsxA und EsxB essentiell ist. EsxA konnte außerdem im Zelllysate und –überstand sechs weiterer klinischer *S. oralis*-Lysate nachgewiesen werden.

## 5 DISKUSSION

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des ESX-1 Sekretionssystems von *S. oralis* Uo5. Bisher gibt es keine Untersuchung dieses Systems in Streptokokken. Daher wurde zunächst die Transkription des ESX-1 Systems in *S. oralis* Uo5 analysiert, wodurch zusätzlich die Funktionalität eines putativen Terminators innerhalb des Clusters bestätigt wurde. Des Weiteren wurden die Eigenschaften der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB untersucht, wobei die Analyse der Sekundärstruktur, der Stabilität der Proteine sowie deren Stöchiometrie, d.h. das Vorliegen als Monomere oder Oligomere im nativen Zustand, im Fokus standen. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass diese Proteine ins Medium sekretiert werden, wozu ein weiteres Protein, das vom ESX-1 Cluster kodiert wird, EssC, von Bedeutung ist.

Im letzten Teil der Arbeit wurde eine bioinformatische Analyse durchgeführt, bei der der Aufbau des ESX-1 Sekretionsclusters in der Gattung *Streptococcus* verglichen wurde. Innerhalb der Art *S. oralis* wurden diverse klinische Isolate immunologisch auf die Expression und Sekretion der beiden WXG-100 Proteine untersucht.

Inwieweit die erhaltenen Ergebnisse zur Charakterisierung des ESX-1 Sekretionssystems von *S. oralis* Uo5 beitragen und in welchem Zusammenhang diese mit Ergebnissen aus anderen Organismen stehen, wird im Folgenden diskutiert.

### 5.1 Negativer Einfluss eines internen Terminators auf die Transkription des ESX-1 Sekretionsclusters von *S. oralis* Uo5

Transkripte des ESX-1 Sekretionsclusters von *S. oralis* Uo5 konnten anhand verschiedener Methoden nachgewiesen werden. So wurde durch RT-PCRs, die die gesamte Länge des ESX-1 Clusters abdeckten, gezeigt, dass dieses Cluster vollständig transkribiert wird (Kapitel 4.2.2). Die Durchführung von qRT-PCRs einzelner Gene des ESX-1 Sekretionsclusters zeigte zudem die unterschiedliche Quantität der Transkripte von *esxA* (erstes Gen des Clusters, kodierend für WXG-100 Protein), von *esaA* (zweites Gen), von *essC* (sechstes Gen, kodierend für eine FtsK/SpoIIIE-ATPase) und von *esxB* (letztes bzw. achtes Gen, kodierend für WXG-100 Protein). Im Verhältnis zu *gyrA*, einem nicht regulierten Kontrollgen, wird *esxA* im Wildtyp Uo5

bei einer Zelldichte von  $N = 40 \times 18$  x stärker transkribiert, wohingegen die Transkription der anderen untersuchten Gene drastisch reduziert ist. *EsaA*, *essC* und *esxB* werden lediglich um den Faktor 0,15 bis 0,38 bezogen auf *gyrA* transkribiert, wobei *esaA* den höchsten Wert von 0,38 zeigt. Ein Abfall der Transkription auf 0,15 x ist bei *essC* zu beobachten, wobei die Transkription von *esxB* wieder geringfügig auf 0,31 x ansteigt (Abbildung 4.4). Eine Sequenzanalyse lieferte allerdings keine Hinweise auf zusätzliche Promotoren oder Terminatoren zwischen *esaA* und dem Ende des Clusters, die die Schwankungen der Transkriptmengen von *esaA*, *essC* und *esxB* erklären könnten.

In Northern Blot-Experimenten mit einer genspezifischen Sonden in *esxA* konnte ein *esxA*-Transkript detektiert werden, das der Länge des Gens entspricht (Abbildung 4.5), was die Transkription dieses Gens bestätigt. Allerdings konnten Transkripte mit *esaA*- und *esxB*-Sonden nicht detektiert werden. Da das ESX-1 Cluster eine Größe von  $> 10$  kb hat, aber eine Detektion des Größenstandards schon ab einer Länge von  $> 3$  kb problematisch bzw. nicht mehr möglich war, konnte keine Aussage über die Transkription von *esaA* und *esxB* mit dieser Methode getroffen werden.

Die enorme Differenz der Transkriptmenge zwischen *esxA* und den nachfolgenden Genen, die die qRT-PCR-Daten belegen, liefert einen starken Hinweis darauf, dass es sich bei dem putativen Terminator zwischen *esxA* und *esaA* um einen funktionalen Terminator handelt. Faltet man diese RNA-Sequenz mit dem Vorhersageprogramm mfold (Zuker, 2003), erhält man eine Stamm-Schleife-Struktur mit nachfolgender Poly-U-Sequenz, die mit  $-18,9$  kJ/mol sehr stabil ist (Abbildung 4.2). Ein Beweis für die Funktionalität dieses Terminators konnte durch die Deletion desselben erbracht werden, da die Transkriptmenge von *esaA* in diesem Stamm nahezu das Level von *esxA* erreicht. Auch die Transkriptmengen von *essC* und *esxB* sind in diesem Stamm erhöht, allerdings steigen die Werte lediglich 4 x, wohingegen die Transkription von *esaA* 20 x erhöht ist (Abbildung 4.4).

Der Terminator zwischen *esxA* und *esaA* ist nicht nur in *S. oralis* Uo5 vorhanden, auch in allen anderen Streptokokken-Arten, die ein ESX-1 Sekretionscluster bzw. Teile davon besitzen, konnten Terminatorsequenzen zwischen *esxA* und *esaA* identifiziert werden. Die Faltungsvorhersage ergab bei allen Arten ähnliche Strukturen und Stabilitäten (Abbildung 4.2). Außerdem konnte durch ein Alignment gezeigt werden, dass es sich bei der GC-reichen Sequenz, die die Stamm-Schleife-Struktur ausbildet, und der darauf folgenden Poly-U-

Sequenz um konservierte Regionen handelt (Abbildung 4.2). Da dieser Terminator aus keinem anderen Organismus bekannt ist, scheint es sich hierbei um einen Streptokokken-spezifischen Terminator zu handeln.

Eine Ausnahme davon stellt die Art *S. gallolyticus* dar, deren alternativer Aufbau des ESX-1 Systems später diskutiert wird.

Doch aus welchem Grund wird die Transkription aller Gene des ESX-1 Clusters downstream von *esxA* in Streptokokken durch einen internen Terminator negativ beeinflusst?

Eine Abschaltung des Systems wegen Nachteilen, die das Bakterium durch die Expression des ESX-1 Clusters hat, ist unwahrscheinlich. Bei der rasanten Evolution von Bakterien kommt es häufig zu Punktmutationen, die z.B. als Nonsense- oder Missense-Mutationen dazu führen, dass Gene frühzeitig durch ein Stoppcodon abbrechen oder die Proteine fehlerhaft und nicht mehr funktionell sind. Handelt es sich bei diesen Genen um essentielle Gene, oder bringen die Proteine den Bakterien einen Vorteil z.B. in der Virulenz, entstehen gravierende Nachteile für den Organismus beim Fehlen dieser Proteine, weswegen sich die genetische Veränderung evolutionär nicht behaupten wird. In den Genomen von Bakterien finden sich oft Beispiele für deletierte oder veränderte Gene, die rudimentär im Chromosom verblieben sind und dem Bakterium ursprünglich keinen Vorteil verschafften. In allen Streptokokken-Arten, die das ESX-1 Sekretionssystem bzw. Teile davon besitzen, sind keine Pseudogene innerhalb des Clusters zu finden.

Da das ESX-1 System in anderen Organismen stark reguliert ist, könnte es sich bei dem internen Terminator allerdings um einen Regulationsmechanismus handeln. Besonders ausgeprägt ist die Regulation des ESX-1 Sekretionssystems von *M. tuberculosis* (2.1.1.1). Der globale Transkriptionsregulator PhoP aktiviert einige Komponenten des Systems (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008 und Frigui *et al.*, 2008), im Promotorbereich von *esxA* in *S. oralis* Uo5 konnten allerdings keine Repeats identifiziert werden, die auf eine Regulator-Bindestelle hinweisen. Außerdem wird das ESX-1 Sekretionssystem von *M. tuberculosis* durch zwei weitere Mechanismen reguliert, wobei u.a. die im Cluster kodierte Protease MycP1 EspB proteolysiert, welches wiederum zusammen mit den WXG-100 Proteinen sekretiert wird und für diese Sekretion essentiell ist (Ohol *et al.*, 2010 und 2.1.1.1). Auch innerhalb des Clusters wird der Transkriptionsfaktor EspR kodiert, der EspA aktiviert, was ebenfalls essentiell für die Sekretion der WXG-100 Proteine ist. Da EspR selbst Substrat der ESX-1 vermittelten Sekretion ist, entsteht



ein negativer Feedback-Loop (Raghavan *et al.*, 2008). In *S. aureus* wurde gezeigt, dass eine Regulation durch das Wachstum einiger Stämme in der Anwesenheit von humanem Serum stattfindet, wobei EsxA in diesem Fall sekretiert wird, da EsaD aktiviert ist, was essentiell für die Sekretion von EsxA ist (Anderson *et al.*, 2011). Da in *S. oralis* Uo5 kein EsaD-Homolog identifiziert werden konnte, kann die Regulation des ESX-1 Systems nicht über EsaD laufen.

Wird das ESX-1 Clusters von *S. oralis* Uo5 und anderen Streptokokken mit internem Terminator über diesen reguliert, so müsste zum Anschalten der Gene downstream des Terminators eine Antitermination erfolgen. Der Regulationsmechanismus der Termination und Antitermination ist in Bakterien bekannt. Dabei ist die Art des Mechanismus von der Art des Terminators abhängig. Einzelne intrinsische Terminatoren werden meist durch eine passive Antitermination überlesen, bei der die Bildung der Terminatorstruktur durch verschiedene Faktoren verhindert wird (Santangelo *et al.*, 2011). Auch das Übergehen mehrerer aufeinanderfolgender Terminatoren ist durch aktive bzw. prozessive Antitermination möglich (Weisberg *et al.*, 1999). Im Falle des Terminators innerhalb des ESX-1 Systems von Streptokokken scheint es sich allerdings um einen einzelnen intrinsischen Terminator zu handeln. Bei dieser Art Termination kommt es zur Dissoziation des Elongationskomplexes, der aus der RNA-Polymerase, der DNA und dem neu synthetisierten RNA-Strang besteht (Gusarov *et al.*, 1999). Die Antitermination kann auf verschiedene Arten erfolgen. Es ist möglich, dass die Ausbildung der Terminatorstruktur durch ein RNA-bindendes Protein verhindert wird oder die Bildung einer alternativen Struktur wird stabilisiert. Diese Proteine sind Sequenzspezifisch und deswegen schwer zu identifizieren (Santangelo *et al.*, 2011). Ein Beispiel für diese Art Regulation ist das *hut* Operon von *B. subtilis*, dessen Antiterminator HutP durch das Substrat L-His aktiviert wird (Kumarevel *et al.*, 2005). Auch die Antitermination durch ein angehaltenes Ribosom, die sog. Attenuation, ist möglich. Dabei kontrolliert das Ribosom die Transkription von Operons zum Aminosäurestoffwechsel durch das Level an beladenen tRNAs (Yanofsky, 1981), z.B. bei der Regulation des Trp-Operons von *E. coli*. Da es sich beim ESX-1 System nicht um ein Aminosäurestoffwechsel-Operon handelt, ist diese Möglichkeit wenig wahrscheinlich. Auch durch Riboswitches kann eine Antitermination erfolgen. Dabei wird die Terminatorstruktur durch die Bindung von kleinen Molekülen oder durch die Änderung der Ionenkonzentration verändert (Winkler *et al.*, 2002, Park *et al.*, 2010).

Es sind also viele Mechanismen bekannt, durch die eine Antitermination stattfinden kann. Erfüllt der interne Terminator zwischen *esxA* und *esaA* in *S. oralis* Uo5 bzw. in anderen Strep-

tokokken eine regulatorische Rolle, müsste der negative Einfluss des Terminators auf die Transkription durch Antitermination aufgehoben werden können. Ob, unter welchen Bedingungen und durch welchen Mechanismus dies geschieht, ist nicht bekannt. Da die meisten Antiterminationsmechanismen bei der Regulation von Stoffwechsel-Operons beteiligt sind, scheint die eventuelle Antitermination durch ein spezifisches RNA-bindendes Protein am wahrscheinlichsten. Es wäre denkbar, dass ein solcher Antiterminator direkt oder indirekt unter *in vivo*-Bedingungen im Wirt, z.B. durch humane Bestandteile aktiviert werden könnte, wenn das ESX-1 Sekretionssystem eine Rolle bei der Interaktion mit Wirtszellen spielen würde. In diesem Fall wäre das System während des Wachstums *in vitro* abgeschaltet, weil dem Bakterium kein Vorteil durch die Expression des Clusters entstünde.

Dies würde bedeuten, dass diese Systeme bei Streptokokken im Vergleich mit anderen Organismen, die ESX-Sekretionssysteme tragen, nicht posttranskriptionell (2.1.1.1), sondern während der Transkription reguliert werden.

*S. gallolyticus* besitzt diesen internen Terminator nicht, allerdings befindet sich das erste Gen des Clusters (*esxA*) auf dem komplementären Strang, es wird also nicht zusammen mit dem restlichen Cluster abgelesen. Ob dies dazu führt, dass auch hier das ESX-1 Cluster nur sehr schwach transkribiert wird, ist unbekannt.

Da die Transkriptmenge der getesteten Gene des ESX-1 Clusters im Wildtyp *S. oralis* Uo5 bei einer Zelldichte von  $N = 40$  und  $N = 100$  nahezu identisch ist (Abbildung 4.4), handelt es sich vermutlich um eine wachstumsphasenunabhängige Transkription. Allerdings müssten zur Bekräftigung dieser Aussage noch weitere Zeitpunkte in der Wachstums- und auch in der stationären Phase untersucht werden, da in diesem Experiment nur die frühe und späte exponentielle Phase analysiert wurden.

## 5.2 Die WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 – Substrate des ESX-1 Sekretionssystems

WXG-100 Proteine sind ca. 100 Aminosäuren lang, besitzen ein zentrales Trp-Xxx-Gly-Motiv und werden durch Typ VII-Sekretionssysteme von Bakterien in das umgebende Medium sekretiert (Pallen, 2002).

### 5.2.1 Detektion und Lokalisation der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 *in vivo*

Auch das ESX-1 Sekretionssystem von *S. oralis* Uo5 kodiert für zwei WXG-100 Proteine, EsxA und EsxB. Um diese detektieren zu können, wurden zunächst Antiseren gegen die rekombinant hergestellten Proteine generiert. Dazu wurden EsxA und EsxB als N-terminale GST-Fusionsproteine in *E. coli* hergestellt und isoliert; die Abspaltung des GST-tag erfolgte durch eine spezifische Protease (Kapitel 3.29). Zur Detektion von EsxA wurde  $\alpha$ EsxA F2, zur Detektion von EsxB  $\alpha$ EsxB M verwendet. Es konnte mithilfe von Deletionsstämmen nachgewiesen werden, dass die beiden Antiseren das jeweilige WXG-100 Protein spezifisch erkennen (Abbildung 4.6). Allerdings reagieren die Antiseren auch mit vielen anderen Proteinen. Im Fall von  $\alpha$ EsxA handelt es sich dabei fast ausschließlich um Proteine mit einem höheren Molekulargewicht, sodass das EsxA-Signal deutlich identifizierbar ist. Bei EsxB werden allerdings auch Proteine detektiert, die Signale im Bereich der EsxB-Bande liefern, weswegen das EsxB-Signal nur eindeutig bei einem Vergleich zwischen Proben des Wildtypes und Proben des Deletionsderivates erkennbar ist.

Mithilfe der Antiseren gegen EsxA und EsxB konnte gezeigt werden, dass die WXG-100 Proteine auch von *S. oralis* Uo5 sekretiert werden (Kapitel 4.3). Allerdings wird anhand dieser Western Blots ersichtlich, dass nur ein kleiner Teil der Proteine sekretiert wird, der größte Teil verbleibt im Cytoplasma. Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8 beweisen, dass EsxA und EsxB quantitativ aus dem Kulturmedium gefällt werden können, sodass kein bzw. wenig Protein verloren geht. Im Gegensatz zu *S. oralis* Uo5 sind EsxA und EsxB vom Stamm *S. aureus* Newman vollständig im Kulturmedium lokalisiert (Burts *et al.*, 2005). Durch Western Blots wurde bewiesen, dass sich die WXG-100 Proteine dieses Stammes weder in der Cytoplasma-

noch in der Zellwand- oder der Membranfraktion befinden. Für die Lokalisation der WXG-100 Proteine von *M. tuberculosis* wurden hingegen widersprüchliche Daten veröffentlicht. Pym *et al.* (2003) beschreiben, dass ESAT-6 weder im Cytoplasma noch in der Membranfraktion, sondern in der Zellwandfraktion lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu beschreiben Berthet *et al.* (1998) ESAT-6 und CFP-10 als sekretierte Proteine.

Anhand von Western Blots wurde die Menge an EsxA und EsxB pro cfu grob abgeschätzt (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8). Eine cfu enthält 255 Moleküle EsxA und sekretiert 47; 9.639 Moleküle EsxB befinden sich in einer cfu und 265 Moleküle werden sekretiert. Diese Werte bestätigen die Beobachtung, dass ein Großteil der WXG-100 Proteine im Cytoplasma lokalisiert ist, wohingegen nur ein geringer Anteil in das umgebende Kulturmedium exportiert wird. Allerdings stehen diese Werte im Konflikt mit den Daten, die eine 38 x höhere Transkriptmenge von *esxA* gegenüber *esxB* mittels qRT-PCR beweisen (Kapitel 4.2.3). Die Molekülmengenbestimmung enthält aber auch einige Fehlerquellen. Zunächst ist die Abschätzung der EsxA- bzw. EsxB-Menge der Proben sehr ungenau, da die Signalintensität der WXG-100 Proteine relativ schwach ist, wobei gleichzeitig unspezifische Signale detektiert werden. Für eine verbesserte Detektion könnten die Antiseren über eine Affinitätssäule gereinigt werden, was die Spezifität und die Konzentration der Antikörper erhöhen würde. Für eine exakte Molekülmengenbestimmung müssten die Signalintensitäten digital quantifiziert werden. Außerdem stellte sich die Konzentrationsbestimmung von EsxA und EsxB als sehr schwierig dar, da die Werte, die mittels OD<sub>280</sub>-Messung (3.27.1) und Bradford-Assay (3.27.2) ermittelt wurden, um bis zu 20 % voneinander abwichen. Zur genauen Mengenbestimmung hätte zudem die exakte Lebendkeimzahl der Probe bestimmt werden müssen, aus der das Lysat hergestellt, bzw. der Überstand gewonnen wurde. Da *S. oralis* als Diplokokken bzw. in kurzen Ketten wächst, ist auch die Bestimmung der cfu selbst nicht eindeutig.

Die Gründe für die hauptsächliche Lokalisation der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5 im Cytoplasma sind nicht bekannt. Ein möglicher Aspekt könnte die sehr niedrige Transkription des ESX-1 Clusters downstream des ersten Gens *esxA*, und damit auch die wahrscheinlich geringe Proteinmenge dieser Gene, darstellen. Für *S. aureus* sind einige Proteine des ESX-1 Systems als essentiell für die Sekretion beschrieben (Burts *et al.*, 2005, Burts *et al.*, 2008, Anderson *et al.*, 2011), andere Proteine des Systems übernehmen evtl. eine akzessorische Rolle. So könnte es also zu einer verminderten Sekretion der WXG-100 Proteine kommen, wenn andere Proteine, die an dieser Sekretion beteiligt sind, fehlen oder in einer zu geringen

Menge vorliegen. Zum Beispiel fehlt ein EsaD-Homolog in *S. oralis* Uo5. EsaD ist ein für die Sekretion der WXG-100 Proteine von *S. aureus* essentielles Protein, das downstream von *esxB* kodiert wird (Anderson *et al.*, 2011).

Durch die Western Blot Analysen mit EsxB-Antiserum wurde zusätzlich die Funktionalität des ESX-1-internen Terminators bestätigt, da im Stamm mit der Deletion des Terminators deutlich mehr EsxB im Cytoplasma detektierbar war als im Wildtyp Uo5 (Abbildung 4.9). Laut qRT-PCR liegt 4 x mehr *esxB*-Transkript im Stamm Uo5  $\Delta$ ter\_esaA vor als im Wildtyp (Abbildung 4.4). Korrelierend damit ist das EsxB-Signal des Deletionsstamm-Lysats bei einer Western Blot Analyse ca. 4 x stärker als das EsxB-Signal des Wildtyps, allerdings ist die EsxB-Menge im Kulturüberstand nur gering erhöht, was wiederum darauf hinweist, dass die Sekretion aufgrund unbekannter Ursachen gesättigt ist. Aber eine Deletion dieses Terminators wirkt sich nicht nur auf EsxB aus. EsxA ist in diesem Fall nicht mehr im Zelllysats detektierbar, sondern ausschließlich im Kulturüberstand, wo die EsxA Menge im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (Abbildung 4.9). Als Grund dafür könnte die 4 x erhöhte Expression von *essC* in Betracht gezogen werden (Abbildung 4.4). EssC besitzt FtsK/SpoIIIE-Domänen und agiert in anderen Organismen mit ESX-1 Sekretionssystem als Transporter der WXG-100 Proteine (Pallen, 2002). Dies würde wiederum bedeuten, dass die Sekretion von EsxA im Wildtyp Uo5 aufgrund der geringen Transkription von *essC* und der damit geringen Menge an EssC limitiert ist. Zur Bestätigung dieser Vermutung wäre eine Überexpression von EssC denkbar.

In *S. aureus* sind die WXG-100 Proteine jeweils essentiell für die Translation des anderen, d.h. dass bei einer Deletion von *esxA* kein EsxB produziert wird und umgekehrt (Burts *et al.*, 2005), obwohl die Transkripte durch RT-PCR nachgewiesen werden können. Bei Western Blot Analysen der Deletionsderivate *S. oralis* Uo5  $\Delta$ esxA bzw. *esxB::aphIII* mit Antiseren gegen EsxA und EsxB konnten diese Proteine in diesen Stämmen im Gegensatz zu *S. aureus* nachgewiesen werden, d.h. EsxA und EsxB werden in beiden Deletionsstämmen der WXG-100 Proteine translatiert. Allerdings sind EsxA bzw. EsxB bei Fehlen des jeweils anderen WXG-100 Proteins ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. EsxA und EsxB sind also gegenseitig nicht essentiell für die Translation wie bei *S. aureus*, sondern für die Sekretion. Worauf diese Abhängigkeit beruht, ist nicht bekannt. Eine Interaktion der beiden Proteine miteinander bzw. mit dem Sekretionsapparat wäre denkbar.

### 5.2.2 Die Rolle von EssC bei der Sekretion der WXG-100 Proteine von *S. oralis* Uo5

Alle bisher identifizierten ESX-1 Sekretionscluster beinhalten ein Gen für eine FtsK/SpoIIIE-ATPase, wobei dieses Protein bei *M. tuberculosis* von zwei aufeinanderfolgenden Genen kodiert wird (Pallen, 2002). Es wurde gezeigt, dass eine Deletion dieser Gene bzw. dieses Gens in *M. tuberculosis* bzw. *S. aureus* dazu führt, dass die WXG-100 Proteine nicht mehr exportiert werden (Pym *et al.*, 2003, Stanley *et al.*, 2003, Guinn *et al.*, 2004, Burts *et al.*, 2005). EssC-Proteine weisen hohe Sequenzähnlichkeiten mit FtsK und SpoIIIE auf. FtsK ist ein Protein, das bei der Zellteilung von *E. coli* eine Rolle spielt und dabei für die Peptidoglycan-Synthese bzw. -Modifikation zuständig ist (Begg *et al.*, 1995), SpoIIIE ist bei der DNA-Segregation während der Sporenbildung und interzellulärem DNA-Transport von *B. subtilis* beteiligt (Wu *et al.*, 1994). Die FtsK/SpoIIIE-Domäne gehört zur allgemeinen Familie der AAA+ Domänen, die eine ATPase-Funktion besitzen (Neuwald *et al.*, 1999).

Nachfolgend zeigt ein Alignment von EssC aus *S. aureus* mit EssC von *S. oralis* Uo5 die Ähnlichkeit der beiden Proteine.

	1						60
<i>S. aureus</i>	MHKLIKYNK	QLKM-LNLRD	GKTYTISEDE	RADITLKS LG	EVHLEQNNQ	GTWQANHTSI	
<i>S. oralis</i>	.K.Q..F.SQ	G.RYEVE.SA	D..VL.GAT.	K.QVY.SQQE	IP.Q.KVDGD	EVFYQYDDEA	
	61						120
<i>S. aureus</i>	NKVLVRKGDL	DDITLQLYTE	ADYASFAYPS	IQDTMTIGPN	AYDDMVIQSL	MNAIIKDFQ	
<i>S. oralis</i>	G--.LKD.--	----.R.GEV	VF.LREGE.R	VY.LLDLSEF	QIGSQ--RGA	LITLDEDVEL	
	121						180
<i>S. aureus</i>	SIQESQYVRI	VHDKNTDVYI	NYELQEQLTN	KAYIGDHIYV	EGIWLEVQAD	GLNVLSQNTV	
<i>S. oralis</i>	LL.K..NQWK	LTRLKGAF.R	.NH.EQMDQQ	LIGF..ELSL	GAVTIKFYP.	EVW.QGPAQ.	
	181						240
<i>S. aureus</i>	ASSLIRLTQE	MPHAQADDYN	TYHRSPRIH	REPTDDIKIE	RPPQPIQKNN	TVIWRSIIPP	
<i>S. oralis</i>	GQQ.T-.REP	SRYGfYE..P	D.....Y	.GSE.K.L.N	P.G.EPV.PS	DELLKL.V..	
	241						300
<i>S. aureus</i>	LVMIALTVVI	FLVRPIGIYI	LMIGMSTVT	IVFGITTYFS	EKKYKNDVE	KREKDYKAYL	
<i>S. oralis</i>	.M.VGV..L.	T.IQ.R....	.ATV...IT.	MI.S.RGFIK	NR...KA.KK	E.VDL.RL..	
	301						360
<i>S. aureus</i>	DNKSKEINKA	IKAQRFS LNY	HYPTVAEIKD	IVETKAPRIY	EKTSHHDFL	HYKLGIANVE	
<i>S. oralis</i>	KD.V..LTRL	ERE.KEGMH.	.F..IL.LT.	L..SYNH...	...PL.F...	Y.R..LGKMP	
	361						420
<i>S. aureus</i>	KSPKLDYQEE	EFNQRRDEL F	DDAKELYEFY	TDVEQAPLIN	DLNHGPIAYI	GARHLILEEL	
<i>S. oralis</i>	T.YD.K.GQQ	.RSGKK.A.E	EEGYA..SRH	KKIPDM.IPA	N.S...VG..	.P.N.V..Q.	
	421						480
<i>S. aureus</i>	EKMLIQLSTF	HSYHDLEFLF	VTREDEVETL	KWARWLPHMT	LRGQNIRGFV	YNQRTDQIL	
<i>S. oralis</i>	QLLVM..A..	.....VQ.IT	ILP.E.K.QW	S.M.....AK	.QEL.V....	.....V.	
	481						540
<i>S. aureus</i>	TSIYSMIKER	IQAVRERSRS	NEQ	LIFTFQL	VFVITDMSLI	IDHVILEYVN	QDLSEYGISL
<i>S. oralis</i>	N.LNQIL.L.	-RSQK.EASH	K.STL.H.HY	.VLV..EK..	L..I.M.FFT	E.PT.L.C..	
	541						600
<i>S. aureus</i>	IFVEDVIESL	PEHVDTIIDI	KSRTEGELIT	KEKELVQLKF	TPENID-NVD	KEYIARRLAN	
<i>S. oralis</i>	.....MS..	S.NIQ.V.N.	.D.NT.Q.VM	E.GV.KETD.	RLDHFPADY.	..R...T..P	

	601		660
<i>S. aureus</i>	LIHVEHLKNA IPDSITFLEM YNVKEVDQLD VVNRWRQNET YK	TMAVPLGV	RGKDDILSLN
<i>S. oralis</i>	.N.LQN..SS ....V..M.. .GAETFED.Q .SS..KK.AP ..SL...I.L ..Q..LVQ..		
	661		720
<i>S. aureus</i>	LHEKAHGPHG LVAGTTGSGK SEIIQSYILS LAINFHPHEV AFLLIDYKGG	GMANLFKDLV	
<i>S. oralis</i>	..... .I..... ..T..... ..V.....D. ....N.P		
	721		780
<i>S. aureus</i>	HLVGTITNLD GDEAMRALTS IKAELRKRQR LFGEHDVNIH NQYHKLFKEG	IATEPMPHLF	
<i>S. oralis</i>	..L..... .AQS....A. .N..IHR.E. ....FE.... ...Q.K..N. E....L....		
	781		840
<i>S. aureus</i>	IISDEFAELK SEQPDFMKEL VSTARIGRSL GIHLILATQK PSGVDDQIW	SNSKFKLALK	
<i>S. oralis</i>	L.....VN....I... ..I..V.... .V..... ..R..I...		
	841		900
<i>S. aureus</i>	VQDRQDSNEI LKTPDAADIT LPGRAYLQVG NNEIYELFQS AWSGATYDIE	GDKLEVEDKT	
<i>S. oralis</i>	.A..S....M .H.....E.. QT..... ...V..... ....D.QPD K.DMGI..H.		
	901		960
<i>S. aureus</i>	IYMINDYQQL QAINKDLISGL ED-EETKENQ TELEAVIDHI ESITTRLEIE	EVKRPWLPLI	
<i>S. oralis</i>	..L..EL..Y EIL.E..... ..VD.I..VP ...D.IVH.. QLLCEEQ..P P.PQ.....		
	961		1020
<i>S. aureus</i>	PENVYQEDLV ETDPRKLWSD DAKEVELTLG LKDVPEEQYQ	GPMVLQLKKA	GHIALIGSPG
<i>S. oralis</i>	K.RIAL.E.E .VQPAVA.AQ E-.SLSVL.. MA.I.QA.K. EAVSIN.S.D ...L.Y....		
	1021		1080
<i>S. aureus</i>	YGRITFLHNI IFDVARHHRP DQAHMYLFDF GTNGLMPVTD IPHVADYFTV	DQEDKIAKAI	
<i>S. oralis</i>	T.K....QTA AM.L..K.S. KALT...M.. ....A.LSK L.Q...TMLL ..TE..S.FV		
	1081		1140
<i>S. aureus</i>	RIFNDEIDRR KKILSQYRVT SISEYRKLTG ETIPHFILI DNFDVAKDSP	FQEVFENMMI	
<i>S. oralis</i>	..MEK.LN.. ..L.AD.G.G TLEL..QAS. QEE.AIV..L .SYE.F.EEA YEAEFLKLLV		
	1141		1200
<i>S. aureus</i>	KMTREGLALD MQVTLTASRA NAMKTPMYIN MKTRIAMFLY	DKSEVS	NNVVG QQKFAV--KD
<i>S. oralis</i>	RIS....SIG VHLLV..G.Q TNLRAQL.S. F.HQLSLPQN EAG..RAI..	STPL.MTME.	
	1201		1260
<i>S. aureus</i>	VVGRALLSSD DNVSFHIGQP FKHDETSYN DQINDEVSAM TEFYKGETPN	DIPMPDEIK	
<i>S. oralis</i>	IK....MKRE EVDVIQLAL. VYGANDTQVL NNLRQ..ASL Q.AWT.QR.S A...V.E.LT		
	1261		1320
<i>S. aureus</i>	YEDYRESLNL PDIVANGALP IGLDYEGLVTL QKIKLT--EP AMISSENPRE	IAHIAEIMMK	
<i>S. oralis</i>	MDVFLNLPTT QEAIQ.HE.. .AISC.EAEI IP.NPSTLKN IVVL..GKQS	LQYTICHLVS	
	1321		1380
<i>S. aureus</i>	EIDILNEKYA ICIADSSGEF KAYRHQVANF AEEREDIKAI	HQLMIEDLKQ	REMDGPFKEK
<i>S. oralis</i>	V.NHCLDNH VLLV..NE.Y -SFLKEK..A YISG.E.LDL FSNLDKEITN	.K-ET.KDVQ	
	1381		1440
<i>S. aureus</i>	SLYIINDFKT FIDCTYIPED DVKKLITKGP ELGLNLFVG IHKELIDAYD	KQIDVARKMI	
<i>S. oralis</i>	TFIV.P.LAS .VEKVS.S.. .FYQ.YINAY KY..HFITA. -S.SVFFKVN	PV.K.IKEN.	
	1441		1500
<i>S. aureus</i>	NQFSIGIRIS DQOFFKFRFI QREPVIKENE AYMVANQAYQ	KIRWFK	
<i>S. oralis</i>	TTAV.AM.LY ..SIVEHNSN N..KKLEWDQ ..IYDKGRT. .SKINQTRNR	GINYVRKTLTLP	
	1501		1530
<i>S. aureus</i>			
<i>S. oralis</i>	IRNSSVFKRR NRKTHGYRSW GRLPGSGNKL		

**Abbildung 5.1: Aligment von EssC aus *S. aureus* subsp. *aureus* str. Newman mit EssC von *S. oralis* Uo5 auf Aminosäureebene**

Die Sequenzen wurden der NCBI-Datenbank entnommen und mit dem Programm Multalin verglichen. Gleiche Aminosäuren sind durch Punkte dargestellt, fehlende Aminosäuren durch Striche. Transmembrandomänen des *S. aureus*-Proteins sind grün, die beiden FtsK/SpoIIIE-Domänen gelb hinterlegt.

EssC von *S. oralis* Uo5 zeigt Ähnlichkeiten zu EssC aus *S. aureus*, weswegen es sich hier um Homologe zu handeln scheint. Die Ähnlichkeit besteht vor allem im Bereich der beiden FtsK/SpolIIE-Domänen. Auch der Bereich der ersten Transmembrandomäne (TMD) ist konserviert. Die zweite TMD zeigt bei *S. oralis* Uo5 eine abweichende Aminosäuresequenz, die aber auch größtenteils aus hydrophoben Aminosäuren besteht. Warum die erste TMD doppelt so lang ist wie die zweite, ist nicht bekannt. Im Stamm *S. aureus* Mu 50 sind beide Transmembrandomänen ca. 20 AS lang (Tanaka *et al.*, 2007).

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit dieser beiden Proteine sollte untersucht werden, ob EssC auch in *S. oralis* Uo5 essentiell für die Sekretion der WXG-100 Proteine EsxA und EsxB ist. Dazu wurde eine Western Blot Analyse von Zelllysaten und gefälltem Kulturüberstand des *essC*-Deletionsstammes *S. oralis* Uo5  $\Delta$ essC mit Antiseren gegen EsxA und EsxB durchgeführt (Abbildung 4.9). Bei dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass EsxA ausschließlich im Cytoplasma zu finden ist, wenn *essC* deletiert ist, wobei die Menge an EsxA im Vergleich zum Wildtyp Uo5 nicht sichtbar erhöht ist. Ob sich die Menge an EsxA, die vom Wildtyp sekretiert wird, zusätzlich im Cytoplasma von *S. oralis* Uo5  $\Delta$ essC befindet, ist unklar, da das EsxA-Signal des Kulturüberstandes des Wildtyps sehr schwach ist. Es konnte also gezeigt werden, dass EssC für die Sekretion von EsxA essentiell ist, EssC erfüllt also wahrscheinlich eine ähnliche Aufgabe wie in *S. aureus*. Auch EsxB ist bei einer Deletion von *essC* nicht mehr im Kulturmedium detektierbar, allerdings ist EsxB auch nicht mehr im Cytoplasma detektierbar. Dies entspricht den Daten, die bei einem analogen Experiment mit *S. aureus* erzielt wurden, wobei allerdings beide WXG-100 Proteine weder im Zelllysaten noch im Kulturüberstand detektierbar waren. Burts *et al.* (2005) schlagen vor, dass EsxA und EsxB bei einer Akkumulation im Cytoplasma rapide degradiert werden oder deren Menge durch eine posttranskriptionelle Feedback-Inhibierung reduziert wird. Eine Verhinderung der Transkription ist nicht möglich, da Transkripte der beiden Gene nachgewiesen wurden.





aufweisen. Bei linearen Proteinen wird das Adsorptionsmaximum hin zu einem größeren Molekulargewicht verschoben, da sie aufgrund ihrer Struktur langsamer durch die Gelmatrix laufen. Das Adsorptionsmaximum von EsxA lag bei diesem Experiment bei 11,75 ml, was einem Molekulargewicht von 40,8 kDa entspricht. Da nur ein einziges Adsorptionsmaximum zu detektieren war, ist davon auszugehen, dass das native EsxA in nur einer Form vorliegt. Dass es sich bei dieser Form um ein Homodimer handelt, konnte mithilfe von Glutaraldehyd gezeigt werden. Glutaraldehyd verlinkt benachbarte Moleküle kovalent. Eine mit Glutaraldehyd behandelte Probe zeigte ein zur unbehandelten Probe identisches Adsorptionsmaximum (Abbildung 4.14 A). Bei der denaturierenden Auftrennung der Elutionsfraktionen der Gelfiltration waren diese Dimere nachweisbar (Abbildung 4.14 B).

Für EsxB konnte ein Adsorptionsmaximum bei 11,64 ml beobachtet werden (Tabelle 4.2). Das daraus berechnete Molekulargewicht beträgt 42,8 kDa, etwas größer als das für EsxA bestimmte Molekulargewicht. Diese Daten stehen in Korrelation zueinander, da das theoretische Molekulargewicht von EsxB ebenfalls etwas größer ist als das Molekulargewicht von EsxA. Im Gegensatz zu EsxA wurden drei Adsorptionsmaxima nach Quervernetzung von EsxB und anschließender Auftrennung über eine Gelfiltrationssäule gemessen. 11,48 ml entspricht dem Homodimer, 13,17 ml dem Monomer, was mittels einer denaturierenden Auftrennung bestätigt wurde (Abbildung 4.14 C und D). Das Maximum bei 9,02 ml wies nur eine geringe Intensität auf, dabei handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Oligomere. EsxB liegt also nativ nicht ausschließlich als Homodimer vor, auch die Existenz von Monomeren ist wahrscheinlich.

Ob EsxA und EsxB auch als Heterodimere vorliegen, lässt sich mit dieser Methode aufgrund des fast identischen Molekulargewichtes nicht nachweisen.

Neben den Strukturen der WXG-100 Proteine von *S. aureus* und *M. tuberculosis* ist auch die Struktur der WXG-100 Proteine von *S. agalactiae* bekannt (Shukla *et al.*, 2010). Diese beiden Proteine bilden ebenfalls Homodimere. Alle bisher im Hinblick auf die Struktur charakterisierten WXG-100 Proteine nehmen die gleiche Tertiärstruktur ein: zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices interagieren durch hydrophobe Wechselwirkungen und werden durch eine kurze unstrukturierte Region, die das WXG-Motiv enthält, voneinander getrennt (Abbildung 2.4).

CD-spektroskopische Analysen ergaben für EsxA und EsxB zwei fast identische Spektren (Abbildung 4.15), deren Form einem charakteristischen Spektrum von  $\alpha$ -helicalen Proteinen

entspricht (Holzwarth *et al.*, 1965), ähnlich wie die publizierten Spektren von *M.tuberculosis* ESAT-6 und dem 1:1 Heterodimer-Komplex von ESAT-6 und CFP-10 (Renshaw *et al.*, 2002). Das CD-Spektrum von CFP-10 alleine hingegen entsprach eher der Form eines unstrukturierter Proteins. Später wurde jedoch durch die Kristallstrukturanalyse von CFP-10 gezeigt, dass dieses Protein ebenfalls die für WXG-100 Proteine typische Form einnimmt (Renshaw *et al.*, 2005). Ein Grund für die abweichende Form des CD-Spektrums von CFP-10 könnte eine eventuelle Degradation des Proteins sein. Des Weiteren wäre es möglich, dass CFP-10 seine typische Form erst einnimmt, wenn es einen 1:1 Komplex mit ESAT-6 bildet. Eine Sekundärstrukturanalyse nach Brahms (Brahms *et al.*, 1980) ergab, dass sowohl EsxA als auch EsxB von *S. oralis* Uo5 zu ca. 70 % aus  $\alpha$ -Helices bestehen. Die Anteile der unstrukturierten Regionen von 13 % bzw. 26 % sind vermutlich auf die N- und C-Termini sowie die kurze Region zwischen den beiden Helices zurückzuführen. Über die Tertiär- bzw. Quartärstruktur lässt sich mit dieser Methode keine Aussage machen.

Dass EsxA im Vergleich zu EsxB sehr viel stabiler ist, konnte mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse gezeigt werden, wobei die Schmelztemperatur von EsxA bei 54°C und die von EsxB lediglich bei 41°C lag (Tabelle 4.3). Die geringe Stabilität von EsxB zeigte sich auch im CD-Spektrum, das nach der Schmelzkurvenanalyse angefertigt wurde. Dabei konnte für EsxA eine nahezu identische Form des Spektrums gemessen werden, d.h. dass die in der Probe enthaltenen Proteine rückgefaltet werden konnten. Das Spektrum von EsxB verlor nach der Schmelzkurvenanalyse an Intensität, was darauf hindeutet, dass ein Teil der Proteine in unlöslichen Aggregaten vorlag.

### 5.3 Verbreitung, Aufbau und Evolution des ESX-1 Sekretionsclusters in *Streptococcus* spp.

Das ESX-1 Sekretionssystem ist nicht nur in zwei Stämmen der Art *Streptococcus oralis* annotiert, laut Genomsequenz besitzen auch fünf weitere Arten dieses System bzw. Teile davon. Sequenzvergleiche der ESX-1 Loci dieser Streptokokken zeigten eine Konservierung der ersten sechs Gene. Einen alternativen Aufbau dieses Clusters besitzt hingegen die Art *S. gallolyticus*.

Die Verbreitung des ESX-1 Clusters innerhalb der Art *S. oralis* wurde durch immunologische Analysen untersucht und mittels PCR-Reaktionen bestätigt.

#### 5.3.1 Verbreitung des ESX-1 Sekretionsclusters innerhalb der Art *Streptococcus oralis*

Insgesamt 21 klinische Isolate der Art *Streptococcus oralis* aus Ungarn, Spanien, Frankreich und Südafrika wurden mit verschiedenen Methoden auf das Vorhandensein bzw. die Expression des ESX-1 Clusters untersucht. Mittels PCR-Reaktionen mit genspezifischen Oligonukleotiden in *esxA* und *esxB* sollte die Anwesenheit der ESX-1 Sequenz bestätigt werden. Allerdings lieferte diese Reaktion bei keinem der verwendeten Stämme, außer bei der Positivkontrolle *S. oralis* Uo5, ein Produkt. Wurde hingegen statt des Primers im letzten Gen *esxB* ein Primer in *essB* verwendet, konnte in 7 Stämmen ein Produkt nachgewiesen werden, wobei es sich um *S. oralis* Uo2, Uo11, S510, SA65, SA67, SA68 und den Kontrollstamm *S. oralis* Uo5 handelte (Abbildung 4.24). Das ESX-1 Cluster kommt also in Isolaten aus Ungarn, Spanien und Südafrika vor. Ob die PCR-Reaktion über das gesamte Cluster keine Produkte aufgrund einer zu geringen Identität des Primers oder aufgrund der Unvollständigkeit des Clusters in diesen Stämmen lieferte, ist nicht bekannt. Dass das ESX-1 Cluster oder Teile davon auch in den anderen untersuchten Stämmen vorkommen, ist nicht auszuschließen.

Der Nachweis der WXG-100 Proteine der klinischen *S. oralis*-Isolate erfolgte durch Western Blot Analysen mit den in dieser Arbeit hergestellten Antiseren gegen EsxA und EsxB von *S. oralis* Uo5 (Kapitel 3.29). Dabei korrelieren die Daten der PCR-Reaktion mit den Daten der Western Blot Analyse: EsxA konnte sowohl im Zelllysats als auch im Kulturüberstand der Stämme nachgewiesen werden, die auch bei der oben beschriebenen PCR-Reaktion ein Pro-

dukt lieferten (Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23). Die Detektion von EsxB war allerdings nicht möglich, da bei den klinischen Isolaten im Bereich der Laufhöhe von EsxB sehr viele unspezifische Banden auftraten. Es kann also keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Stämme *S. oralis* Uo2, Uo11, S510, SA65, SA67 und SA68 ein unvollständiges ESX-1 Cluster besitzen, dem das 3'-Ende fehlt, oder dieser Bereich so unterschiedlich zu dem Bereich in *S. oralis* Uo5 ist, dass weder Primer hybridisieren noch Antikörper die Proteine detektieren können. Aus diesem Grund kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass ESX-1 Cluster in den anderen untersuchten Stämmen vorkommen, die aber sehr große Sequenzunterschiede zu *S. oralis* Uo5 aufweisen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das ESX-1 Cluster nicht generell in der Art *S. oralis* vorkommt.

### 5.3.2 Aufbau des ESX-1 Sekretionsclusters in *Streptococcus* spp.

Bislang bestand das ESX-1 Sekretionscluster in *S. aureus* aus acht Genen (Burts *et al.*, 2005). EssABC sind Membranproteine, die essentiell für die Expression und Sekretion von EsxAB und EsaC sind. EsaB ist cytoplasmatisch lokalisiert und reguliert die Expression von EsaC. Der Export wird von EssC katalysiert, ein Protein, das zwei FtsK/SpoIIIE-Domänen besitzt.

Kürzlich wurde jedoch ein Gen entdeckt, dessen Genprodukt EsaD essentiell für die Sekretion von EsxA ist. *EsaD* liegt drei Gene downstream von *esxB*, was den ESX-1 Locus von acht auf elf Gene erweitert.

In *S. oralis* Uo5 konnten Homologe der ersten acht Gene des ESX-1 Clusters von *S. aureus* identifiziert werden. Downstream von *esxB* bricht die Homologie ab und auch ein *esaD*-Homolog fehlt in *S. oralis* Uo5. Im Gegensatz zu *S. aureus* findet trotz des Fehlens von EsaD die Sekretion von EsxA statt (Abbildung 4.6). Allerdings könnte die Abwesenheit von EsaD ein Grund dafür sein, dass diese Sekretion sehr gering ist, was dazu führt, dass nur eine kleine Menge EsxA (und EsxB) sekretiert wird. Bei *S. aureus* können EsxA und EsxB ausschließlich im Kulturüberstand detektiert werden, d.h. dass die beiden hauptsächlich exportiert werden (Burts *et al.*, 2005).

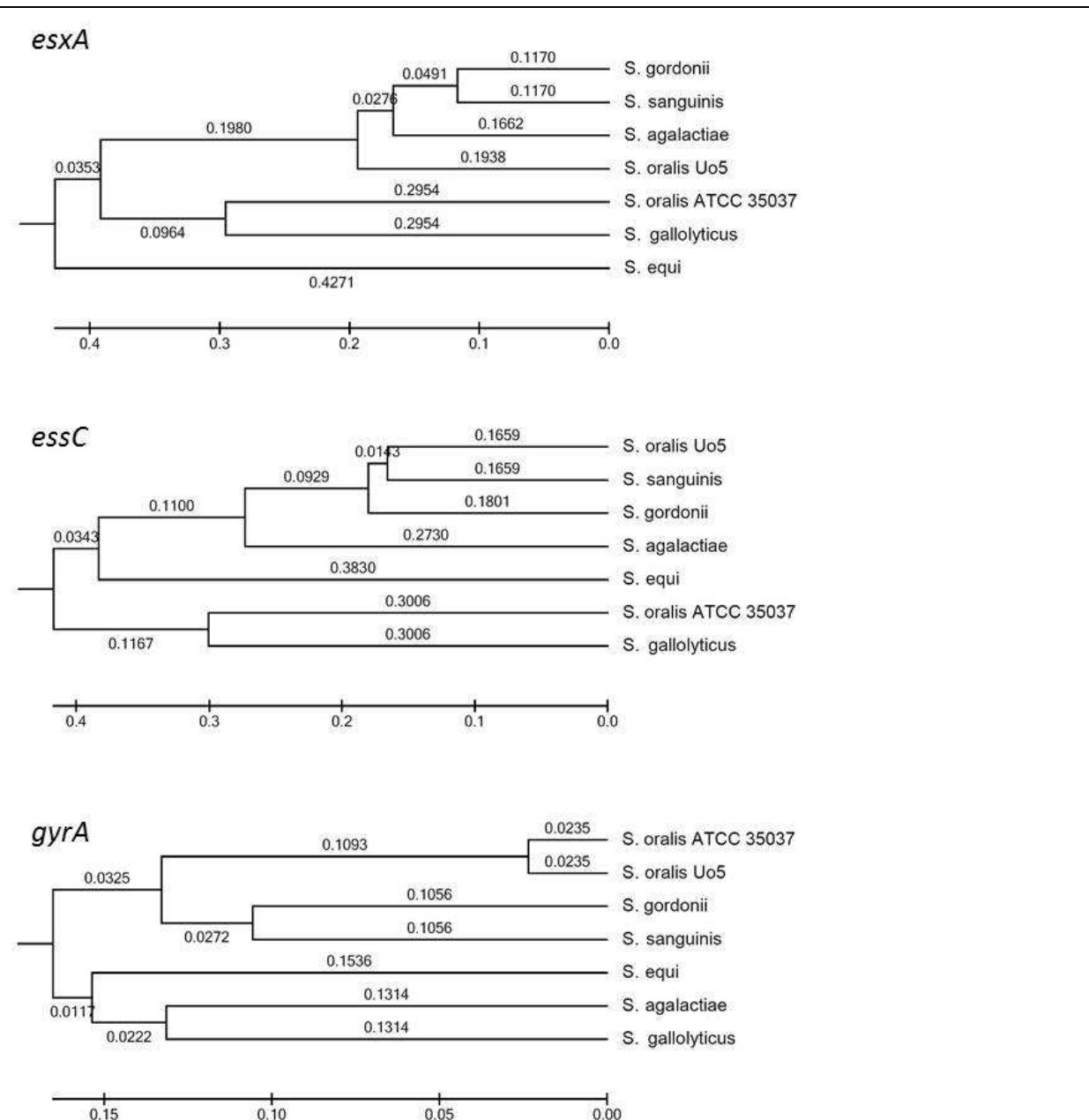
Auch in anderen Streptokokken-Genomen sind Homologe zu Genen des ESX-1 Clusters zu finden. Dabei handelt es sich neben *S. oralis* um die Arten *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. gallolyticus*, *S. gordonii* und *S. sanguinis*. Durch einen Vergleich der genetischen Organisation wurde deutlich, dass der Aufbau dieses Clusters in der Gattung *Streptococcus* variabel ist (Abbildung 4.21).

Außer in *S. oralis* Uo5 wurde nur bei *S. equi* subsp. *zooepidemicus* MGCS10565 *esxB* identifiziert, was allerdings keine Sequenzhomologie zu *esxB* von *S. oralis* Uo5 aufweist, aber ein WXG-Motiv besitzt. Generell scheint der Aufbau des ESX-1 Locus von *esxA* bis einschließlich *essC* konserviert zu sein, die Gene *esaC* und *esxB* sind nur in 3 bzw. 2 Spezies vorhanden. Es scheint außerdem, dass ein ESX-1 Locus mit acht Genen in der Gattung *Streptococcus* eher eine Ausnahme darstellt. Neben *S. oralis* Uo5 ist auch das Genom von *S. oralis* ATCC 35037 sequenziert, allerdings sind hier nur einzelne Sequenzabschnitte (Contigs) erhältlich. Die ersten 6 Gene weisen eine hohe Identität zu *S.o.* Uo5 auf, allerdings befindet sich das 3'-Ende von *essC* an einer Contig-Grenze, weswegen über *esaC* und *esxB* anhand dieser Daten keine Aussage gemacht werden kann.

Eine Ausnahme stellt *S. gallolyticus* dar. Das erste Gen *esxA* befindet sich auf dem Komplementärstrang, sodass auch der Terminator zwischen *esxA* und *esaA* wegfällt, der in allen anderen Streptokokken vorkommt (Abbildung 4.21). Dabei könnte es sich neben einem internen Terminator um einen alternativen Mechanismus handeln, durch den die Expression des ESX-1 Systems reduziert bzw. kontrolliert wird.

### 5.3.3 Evolution des ESX-1 Locus in der Gattung *Streptococcus*

Ein Vergleich phylogenetischer Analysen von Genen des ESX-1 Locus (*esxA* und *essC*) und einem essentiellen Kontrollgen (*gyrA*), das in allen Bakterien vorkommt, sollte Aufschluss über die Evolution dieses Clusters innerhalb der Gattung *Streptococcus* geben. Ergeben die Analysen unterschiedliche Stammbäume, so ist eine sekundäre Verbreitung des Locus nach der Entstehung der einzelnen Arten wahrscheinlich. Hat allerdings ein gemeinsamer Vorfahre dieses Cluster aufgenommen, gleichen sich die Stammbäume.



**Abbildung 5.2: Verwandtschaft der ESX-1 Cluster verschiedener Streptokokken**

Mit dem Programm Mega 5.05 wurden ClustalW-Alignments der Gene *esxA*, *essC* und *gyrA* verschiedener Streptokokken durchgeführt, die die Basis der phylogentischen Stammbäume bilden. Die Zahlen geben Distanzwerte der Äste wieder. Die Genbankeinträge sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Die phylogenetischen Bäume von *esxA* und *essC* unterscheiden sich deutlich von *gyrA*. Während z.B. *gyrA* der beiden *S. oralis* Stämme sehr nahe verwandt ist, zeigen *esxA* und *essC* nur eine sehr weitläufige Verwandtschaft. Dieser Unterschied liefert einen ersten Hinweis darauf, dass verschiedene Streptokokken-Arten (und auch –Stämme) das ESX-1 Cluster nachträglich erworben haben.

Weiterhin ist zu beobachten, dass die Distanzwerte der *esxA*- und *essC*-Stammbäume größer sind als die Werte des *gyrA*-Stammbaumes. Das bedeutet, dass die genetische Varianz des ESX-1 Clusters in Streptokokken hoch ist.

Das folgende Alignment der EsxA-Sequenzen verdeutlicht diese Varianz im Detail.

	1					60
oralis_Uo5		MALIQLTTEE	LRTSAQKYTQ	GSEEVQVLR	TLTQEQTIR	DN <b>WKG</b> AAFES
agalactiae		..Q.K..P..	..S.....A	..QQ.TE..N	L....AV.D	E..D.ST.D.
gordonii		..R.K..P..	..A...R..D	A.N.N...S	S...N.AI.S	E..E.S..Q.
sanguinis		..Q.K..P..	...NR.E	...N.T...T	...N.AI.A	...D.S..D.
equi	M	SGQ.RVSP.T	.QSR.RE.GK	A.NDITTI.N	N.QRL.D.L.	TE.E....QG
oralis_ATC	MTKSKKENND	.PA.S..P.Q	.KSE..T..N	A..QLKDAIN	KVSGANGRLQ	GQ.Q....Q.
gallolytic		.TA.SV.P.Q	.KEQ..V..R	SK.QIE.AIQ	SVNSMNSQ.A	EE...Q..NA
	61					107
oralis_Uo5		FDRQFTELSP	KIEEFATLLD	EINAQLNKVA	EIVEQNDQDL	ASQI
agalactiae		.EA..N....	..T...Q..E	D..Q..L...	D.I..T.A.I	....SG
gordonii		.EE..N....	..K...Q..Q	D....V...	D...T...I	.A..H
sanguinis		.EA..N....	..K.....Q	D....I...	D...T...I	.A..H
equi		..N..N..K.	VQN..E.MQ	Q..T..D.T.	QAMQ....E	SRNFGHLH
oralis_ATC		YLE..QQ..V	SVTQMEQ..E	S.H....QY.	DT.ADR.RQD	.TSFGLN
gallolytic		YLE.YNQ.YT	QVQK.EE..A	S..Q...NY.	.T.AER.AQD	SASFGLN

Dieses Alignment bestätigt die Verwandtschaftsverhältnisse von *esxA* aus Abbildung 5.2, wonach *esxA* der Stämme *S. oralis* ATCC 35037 und *S. gallolyticus* sehr ähnlich ist, sich aber deutlich von *esxA* der anderen Stämme unterscheidet.

Die Wahrscheinlichkeit, dass einige klinische *S. oralis*-Isolate nicht über ein ESX-1 System verfügen, und die Varianz im Aufbau des ESX-1 Locus von Streptokokken sprechen ebenfalls dafür, dass diese Streptokokken das ESX-1 Cluster sekundär erlangt haben.

Konkrete Hinweise darauf, wie *S. oralis* Uo5 diesen Locus aufgenommen haben könnte, wurden bei einer Untersuchung der genomischen Umgebung nicht gefunden. Die Gene up- und downstream kodieren im Wesentlichen hypothetische, ribosomale und Stoffwechselproteine. Downstream von ESX-1 befindet sich allerdings ein Gen, das Sequenzähnlichkeit zu einer Transposase von *S. gallolyticus* besitzt. Transposasen sind mobile genetische Elemente, die oft für eine aktive Übertragung von Sequenzbereichen verantwortlich sind. Ob der Bereich, der das ESX-1 Cluster beinhaltet, durch eine solche Transposase übertragen wurde, ist unklar.



## 5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkription der nachfolgenden Gene durch einen internen Terminator nach dem ersten Gen des ESX-1 Clusters sehr gering ist. Kodiert das Genom von *S. oralis* Uo5 einen Antiterminator, so ist dieser unter den getesteten Bedingungen nicht aktiv. Durch zufällige Mariner-Transposon-Mutagenesen könnte die Identifizierung eines Repressors des Antiterminators im Genom von *S. oralis* Uo5 möglich sein (Martin *et al.*, 2000). Dabei müsste nach einem Phänotyp gescreent werden, der ähnliche Eigenschaften besitzt wie der Stamm, in dem der Terminator deletiert ist. Zu diesen Eigenschaften gehört z.B. eine erhöhte Menge der WXG-100 Proteine im Kulturüberstand.

Durch eine solche Mutagenese wäre auch eine Entdeckung weiterer oder alternativer Faktoren möglich, die das ESX-1 Cluster direkt oder indirekt auf einem sonstigen Weg reprimieren.

Weiterhin wäre interessant, welche Rolle die Proteine EssAB, sowie EsaABC bei der Sekretion der WXG-100 Proteine spielen. Dazu könnten zunächst Deletionsstämme hergestellt werden, bei denen dann die Lokalisierung von EsxA und EsxB mittels der in dieser Arbeit generierten Antiseren untersucht werden kann.

Eine Deletion von *essC* führt dazu, dass EsxA im Cytoplasma akkumuliert während EsxB nicht mehr detektierbar ist. Mittels einer Transkriptionsanalyse könnte geklärt werden, ob *esxB* in der Mutante nicht mehr transkribiert wird, oder ob das Protein EsxB abgebaut wird. Des Weiteren könnte durch teilweise Deletionen von *essC* untersucht werden, ob das vollständige Protein zur Sekretion von EsxA und EsxB essentiell ist, oder ob korrelierend mit *S. aureus* eine der beiden FtsK/SpoIIIE-Domänen ausreichend für den Export ist (Burts *et al.*, 2005).

Bezüglich des ESX-1 vermittelten Exports könnte durch EsaC-Antiseren analysiert werden, ob EsaC ebenfalls sekretiert wird. Bei *S. aureus* ist die Sekretion von EsaC essentiell für die Sekretion der WXG-100 Proteine, weswegen die Menge an EsaC über EsaB kontrolliert wird (Burts *et al.*, 2008).

Die WXG-100 Proteine von *S. aureus* bilden Homodimere (Sundaramoorthy *et al.*, 2008), ESAT-6 und CFP-10 von *M. tuberculosis* liegen als Heterodimere vor (Renshaw *et al.*, 2005). Auch die Kristallstruktur von EsxA aus *S. agalactiae* ist bekannt, wonach EsxA ebenfalls Homodimere bildet (Shukla *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte das Vorliegen von EsxA aus *S. oralis* Uo5 als Homodimer gezeigt werden. Auch EsxB bildet Homodimere, allerdings nicht ausschließlich, da in diesen Versuchen auch die monomere Form identifiziert wurde. Auf-

grund des nahezu identischen Molekulargewichtes dieser Proteine konnte das Vorliegen als Heterodimer nicht untersucht werden. Über diese Frage könnte eine Analyse der Kristallstruktur der nativ aufgereinigten Proteine Aufschluss geben. Dabei wäre zu beachten, dass eine Heterodimerbildung durch *in vitro*-Inkubation der separat aufgereinigten Protein nicht möglich sein könnte, was eine native Isolation aus *S. oralis* Uo5 nötig machen würde.

Diese Arbeit untersucht zum ersten Mal ein ESX-1 Sekretionssystem in Streptokokken, wobei die Analyse dieses Systems vor allem auf molekularer Ebene erfolgte.

In den Organismen *S. aureus* und *M. tuberculosis* ist aber z.B. auch bekannt, dass das ESX-1 Sekretionscluster eine Rolle bei der Virulenz dieser Bakterien spielt. So fungiert ESAT-6 von *M. tuberculosis* beispielsweise als Adhesin, indem es über Laminin an die Wirtszelle bindet (Kinhikar *et al.*, 2010). Diese Bindung von EsxA bzw. EsxB von *S. oralis* Uo5 an Laminin konnte nicht bestätigt werden. In zukünftigen Experimenten wäre es möglich, die Rolle dieses Systems in der Virulenz von *S. oralis* Uo5 zu untersuchen. So würde z.B. die Anwendung von Deletionsderivaten im Vergleich mit dem Wildtyp im Mausmodell einen ersten Hinweis liefern. Weitere Versuche, z.B. durch die Inkubation der WXG-100 Proteine mit diversen eukaryotischen Oberflächenproteinen in einem Biacore-Assay, könnten eventuelle Bindungspartner von EsxA bzw. EsxB identifizieren.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek BJ, Bitter W.** (2007) Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*; **5** (11): 883-891.

**Akpe San Roman S, Facey PD, Fernandez-Martinez L, Rodriguez C, Vallin C, Del Sol R, Dyson P.** (2010) A heterodimer of EsxA and EsxB is involved in sporulation and is secreted by a type VII secretion system in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*; **156** (Pt 6): 1719-1729.

**Alami M, Lüke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, Brunner J, Müller M.** (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell*; **12** (4): 937-946.

**Andersen P, Andersen AB, Sørensen AL, Nagai S.** (1995) Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol*; **154** (7): 3359-3372.

**Anderson M, Chen YH, Butler EK, Missiakas DM.** (2011) EsaD, a Secretion Factor for the Ess Pathway in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*; **193** (7): 1583-1589.

**Avery OT, MacLeod CM, McCarty M.** (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *J Exp Med*; **79** (2): 137-158.

**Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K.** (2008) Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *J Bacteriol*; **190** (1): 300-310.

**Begg KJ, Dewar SJ, Donachie WD.** (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol*; **177** (21): 6211-6222.

**Beres SB, Sesso R, Pinto SW, Hoe NP, Porcella SF, Deleo FR, Musser JM.** (2008) Genome sequence of a Lancefield group C *Streptococcus zooepidemicus* strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease. *PLoS One*; **3** (8): e3026.

**Bergmann C.** Epidemiologie eines Mosaikgens: *pbp2x* in  $\beta$ -Lactam-sensitiven und resistenten oralen Streptokokken aus Spanien [Dissertation]. Kaiserslautern: TU Kaiserslautern; 2003.

**Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B.** (1998) A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*; **144** ( Pt 11): 3195-3203.

**Bracco RM, Krauss MR, Roe AS, MacLeod CM.** (1957) Transformation reactions between *Pneumococcus* and three strains of *Streptococci*. *J Exp Med*; **106** (2): 247-259.

- Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; **72**: 248-254.
- Brahms S, Brahms J.** (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol*; **138** (2): 149-178.
- Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, de Jonge MI, Bottai D, Demangel C, Hinds J, Neyrolles O, Butcher PD, Leclerc C, Cole ST, Brosch R.** (2006) Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun*; **74** (1): 88-98.
- Burts ML, Williams WA, DeBord K, Missiakas DM.** (2005) EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102** (4): 1169-1174.
- Burts ML, DeDent AC, Missiakas DM.** (2008) EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*; **69** (3): 736-746.
- Callahan B, Nguyen K, Collins A, Valdes K, Caplow M, Crossman DK, Steyn AJ, Eisele L, Derbyshire KM.** (2010) Conservation of structure and protein-protein interactions mediated by the secreted mycobacterial proteins EsxA, EsxB, and EspA. *J Bacteriol*; **192** (1): 326-335.
- Caparo MG, Poolman B, Podbielski A.** Streptococcal Peptide Transmembrane Transport: Description of Transport Systems and Biological Consequences. In: Hakenbeck R, Chhatwal S, editors. *Molecular Biology of Streptococci*. Wymondham: Horizon Bioscience; 2007.
- Carratalá J, Alcaide F, Fernández-Sevilla A, Corbella X, Liñares J, Gudiol F.** (1995) Bacteremia due to viridans streptococci that are highly resistant to penicillin: increase among neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis*; **20** (5): 1169-1173.
- Chalkley L, Schuster C, Potgieter E, Hakenbeck R.** (1991) Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett*; **90** (1): 35-42.
- Champion PA, Stanley SA, Champion MM, Brown EJ, Cox JS.** (2006) C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*; **313** (5793): 1632-1636.
- Chen Q, Wu H, Fives-Taylor PM.** (2004) Investigating the role of *secA2* in secretion and glycosylation of a fimbrial adhesin in *Streptococcus parasanguis* FW213. *Mol Microbiol*; **53** (3): 843-856.
- Chi F, Nolte O, Bergmann C, Ip M, Hakenbeck R.** (2007) Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int J Med Microbiol*; **297** (7-8): 503-512.

**Dagkessamanskaia A, Moscoso M, Hénard V, Guiral S, Overweg K, Reuter M, Martin B, Wells J, Claverys JP.** (2004) Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Mol Microbiol*; **51** (4): 1071-1086.

**Daugherty S, Tallon LJ, Jones KM, Liu X, Kilian M, Tettelin H.** (2010) Direct Submission.

**de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, Honoré N, Marchal G, Jiskoot W, England P, Cole ST, Brosch R.** (2007) ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol*; **189** (16): 6028-6034.

**Denapate D, Brückner R, Nuhn M, Reichmann P, Henrich B, Maurer P, Schähle Y, Selbmann P, Zimmermann W, Wambutt R, Hakenbeck R.** (2010) The Genome of *Streptococcus mitis* B6 - What Is a Commensal? *PLoS One*; **5** (2): e9426.

**Flint JL, Kowalski JC, Karnati PK, Derbyshire KM.** (2004) The RD1 virulence locus of *Mycobacterium tuberculosis* regulates DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101** (34): 12598-12603.

**Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sasseti CM, Sherman DR, Bloom BR, Rubin EJ.** (2005) Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102** (30): 10676-10681.

**Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, Brodin P, Garnier T, Gicquel B, Martin C, Leclerc C, Cole ST, Brosch R.** (2008) Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathog*; **4** (2): e33.

**Gey Van Pittius NC, Gamielien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, Beyers AD.** (2001) The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol*; **2** (10): RESEARCH0044.

**Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR, Berks BC.** (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102** (30): 10482-10486.

**Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westervreen J, Huygen K, Hernández-Pando R, Thole J, Behr M, Gicquel B, Martín C.** (2008) PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PLoS One*; **3** (10): e3496.

**Griffith F.** (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*; **27** (2): 113-159.

**Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR.** (2004) Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*; **51** (2): 359-370.

**Gusarov I, Nudler E.** (1999) The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol Cell*; **3** (4): 495-504.

**Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, Gardès C, Keck W, de Saizieu A.** (2001) Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; **69** (4): 2477-2486.

**Hamon MA, Batsché E, Régnault B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, Cossart P.** (2007) Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **104** (33): 13467-13472.

**Hardie JM, Whiley RA.** The genus *Streptococcus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH, editors. The genera of lactic acid bacteria: Blackie Academic and Professional; 1995. p. 55-124.

**Hasona A, Crowley PJ, Levesque CM, Mair RW, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, Brady LJ.** (2005) Streptococcal viability and diminished stress tolerance in mutants lacking the signal recognition particle pathway or YidC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102** (48): 17466-17471.

**Håvarstein LS, Holo H, Nes IF.** (1994) The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology*; **140** ( Pt 9): 2383-2389.

**Håvarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA.** (1995a) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **92** (24): 11140-11144.

**Håvarstein LS, Diep DB, Nes IF.** (1995b) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*; **16** (2): 229-240.

**Highlander SK, Hultén KG, Qin X, Jiang H, Yerrapragada S, Mason EO, Jr., Shang Y, Williams TM, Fortunov RM, Liu Y, Igboeli O, Petrosino J, Tirumalai M, Uzman A, Fox GE, Cardenas AM, Muzny DM, Hemphill L, Ding Y, Dugan S, Blyth PR, Buhay CJ, Dinh HH, Hawes AC, Holder M, Kovar CL, Lee SL, Liu W, Nazareth LV, Wang Q, Zhou J, Kaplan SL, Weinstock GM.** (2007) Subtle genetic changes enhance virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*; **7**: 99.

**Hingley-Wilson SM, Sambandamurthy VK, Jacobs WR, Jr.** (2003) Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol*; **4** (10): 949-955.

**Holzwarth G, Doty P.** (1965) The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. *J Am Chem Soc*; **87**: 218-228.

**Hoskins J, Alborn WE, Jr., Arnold J, Blaszcak LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass JS, Khoja H, Kraft AR, Lagace RE, LeBlanc DJ, Lee LN, Lefkowitz EJ, Lu J, Matsushima P, McAhren SM, McHenney M, McLeaster K, Mundy CW, Nicas TI, Norris FH, O'Gara M, Peery RB, Robertson GT, Rockey P, Sun PM, Winkler ME,**

**Yang Y, Young-Bellido M, Zhao G, Zook CA, Baltz RH, Jaskunas SR, Rosteck PR, Jr., Skatrud PL, Glass JI.** (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J Bacteriol; **183** (19): 5709-5717.

**Hui FM, Zhou L, Morrison DA.** (1995) Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two *lactococcin A* secretion genes. Gene; **153** (1): 25-31.

**Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS.** (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. Res Microbiol; **158** (10): 767-778.

**Jongbloed JD, van der Ploeg R, van Dijk JM.** (2006) Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases. Trends Microbiol; **14** (1): 2-4.

**Kilian M, Poulsen K, Blomqvist T, Håvarstein LS, Bek-Thomsen M, Tettelin H, Sørensen UB.** (2008) Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. PLoS One; **3** (7): e2683.

**Kinhikar AG, Verma I, Chandra D, Singh KK, Weldingh K, Andersen P, Hsu T, Jacobs WR, Jr., Laal S.** (2010) Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells. Mol Microbiol; **75** (1): 92-106.

**Kremer BH, van der Kraan M, Crowley PJ, Hamilton IR, Brady LJ, Bleiweis AS.** (2001) Characterization of the *sat* operon in *Streptococcus mutans*: evidence for a role of Ffh in acid tolerance. J Bacteriol; **183** (8): 2543-2552.

**Kumarevel T, Mizuno H, Kumar PK.** (2005) Structural basis of HutP-mediated anti-termination and roles of the Mg<sup>2+</sup> ion and L-histidine ligand. Nature; **434** (7030): 183-191.

**Lacks S, Hotchkiss RD.** (1960) A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus. Biochim Biophys Acta; **39**: 508-518.

**Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR.** (2003) Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. J Infect Dis; **187** (1): 117-123.

**Lin IH, Liu TT, Teng YT, Wu HL, Liu YM, Wu KM, Chang CH, Hsu MT.** (2011) Sequencing and Comparative Genome Analysis of Two Pathogenic *Streptococcus gallolyticus* Subspecies: Genome Plasticity, Adaptation and Virulence. PLoS One; **6** (5): e20519.

**MacGurn JA, Raghavan S, Stanley SA, Cox JS.** (2005) A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol; **57** (6): 1653-1663.

**Maciag A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palù G, Riccardi G, Manganeli R.** (2007) Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. J Bacteriol; **189** (3): 730-740.

- Maes M, Messens E.** (1992) Phenol as grinding material in RNA preparations. *Nucleic Acids Res*; **20** (16): 4374.
- Magassa N, Chandrasekaran S, Caparon MG.** (2010) *Streptococcus pyogenes* cytolysin-mediated translocation does not require pore formation by streptolysin O. *EMBO Rep*; **11** (5): 400-405.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK.** (1996) Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*; **178** (5): 1274-1282.
- Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H.** (2008) Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*; **16** (1): 33-40.
- Marmur J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*; **3** (2): 208-218.
- Martin B, Prudhomme M, Alloing G, Granadel C, Claverys JP.** (2000) Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*; **38** (4): 867-878.
- Marx P.** Identifizierung kleiner nicht kodierender RNAs in Streptokokken, deren Expression von dem Zwei-Komponenten-System CiaRH abhängt [Diplomarbeit]. Kaiserslautern: TU Kaiserslautern; 2008.
- Müller M.** (2005) Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*; **156** (2): 131-136.
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV.** (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*; **9** (1): 27-43.
- Ohol YM, Goetz DH, Chan K, Shiloh MU, Craik CS, Cox JS.** (2010) *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe*; **7** (3): 210-220.
- Paetzel M, Karla A, Strynadka NC, Dalbey RE.** (2002) Signal peptidases. *Chem Rev*; **102** (12): 4549-4580.
- Pallen MJ.** (2002) The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol*; **10** (5): 209-212.
- Papanikou E, Karamanou S, Economou A.** (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol*; **5** (11): 839-851.
- Park SY, Cromie MJ, Lee EJ, Groisman EA.** (2010) A bacterial mRNA leader that employs different mechanisms to sense disparate intracellular signals. *Cell*; **142** (5): 737-748.



**Pestova EV, Håvarstein LS, Morrison DA.** (1996) Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol*; **21** (4): 853-862.

**Peterson SN, Sung CK, Cline R, Desai BV, Snesrud EC, Luo P, Walling J, Li H, Mintz M, Tsegaye G, Burr PC, Do Y, Ahn S, Gilbert J, Fleischmann RD, Morrison DA.** (2004) Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol Microbiol*; **51** (4): 1051-1070.

**Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST.** (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*; **46** (3): 709-717.

**Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A, Griffiths KE, Marchal G, Leclerc C, Cole ST.** (2003) Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med*; **9** (5): 533-539.

**Raghavan S, Manzanillo P, Chan K, Dovey C, Cox JS.** (2008) Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Nature*; **454** (7205): 717-721.

**Reichmann P, König A, Liñares J, Alcaide F, Tenover FC, McDougal L, Swidsinski S, Hakenbeck R.** (1997) A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*; **176** (4): 1001-1012.

**Reichmann P, Nuhn M, Denapaite D, Brückner R, Henrich B, Maurer P, Rieger M, Klages S, Reinhard R, Hakenbeck R.** (2011) Genome of *Streptococcus oralis* Strain Uo5. *J Bacteriol*; **193** (11): 2888-2889.

**Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, Gordon SV, Hewinson RG, Williamson RA, Carr MD.** (2002) Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6\*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem*; **277** (24): 21598-21603.

**Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, Gordon SV, Hewinson RG, Burke B, Norman J, Williamson RA, Carr MD.** (2005) Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *Embo J*; **24** (14): 2491-2498.

**Rodriguez GM, Voskuil MI, Gold B, Schoolnik GK, Smith I.** (2002) *ideR*, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun*; **70** (7): 3371-3381.

**Rosenbach FJ.** Mikroorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden: J.F. Bergmann; 1884.

**Salles C, Créancier L, Claverys JP, Méjean V.** (1992) The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*; **20** (22): 6103.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

**Santangelo TJ, Artsimovitch I.** (2011) Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nat Rev Microbiol*; **9** (5): 319-329.

**Schmitt G.** Molekulare Werkzeuge zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem regulatorischen Zweikomponentensystem CiaRH und der Lokalisation des Penicillinbindepoteins Pbp2x in *Streptococcus pneumoniae* [Diplomarbeit]. Kaiserslautern: TU Kaiserslautern; 2006.

**Shukla A, Pallen M, Anthony M, White SA.** (2010) The homodimeric GBS1074 from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*; **66** (Pt 11): 1421-1425.

**Sibold C, Henrichsen J, König A, Martin C, Chalkley L, Hakenbeck R.** (1994) Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol*; **12** (6): 1013-1023.

**Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu J, Liu J, McDonald KL, Szyk A, LaRonde-LeBlanc N, Gao LY.** (2008) Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infect Immun*; **76** (12): 5478-5487.

**Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB.** (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*; **63** (5): 1710-1717.

**Stamm LM, Morisaki JH, Gao LY, Jeng RL, McDonald KL, Roth R, Takeshita S, Heuser J, Welch MD, Brown EJ.** (2003) *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med*; **198** (9): 1361-1368.

**Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JS.** (2003) Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100** (22): 13001-13006.

**Sundaramoorthy R, Fyfe PK, Hunter WN.** (2008) Structure of *Staphylococcus aureus* EsxA suggests a contribution to virulence by action as a transport chaperone and/or adaptor protein. *J Mol Biol*; **383** (3): 603-614.

**Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA.** (2001) An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*; **67** (11): 5190-5196.

**Tanaka Y, Kuroda M, Yasutake Y, Yao M, Tsumoto K, Watanabe N, Ohta T, Tanaka I.** (2007) Crystal structure analysis reveals a novel forkhead-associated domain of ESAT-6 secretion system C protein in *Staphylococcus aureus*. *Proteins*; **69** (3): 659-664.

**Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, Madoff LC, Wolf AM, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, DeBoy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Lewis MR, Radune D, Fedorova NB, Scanlan D, Khouri H, Mulligan S, Carty HA, Cline RT, Van Aken SE, Gill J, Scarselli M, Mora M, Iacobini ET, Brettoni C, Galli G, Mariani M, Vegni F, Maione D, Rinaudo D, Rappuoli R, Telford JL, Kasper DL, Grandi G, Fraser CM.** (2002) Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99** (19): 12391-12396.

**Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC.** (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*; **9 Suppl 1**: S2.

**van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ.** (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*; **129** (7): 1287-1298.

**Vickerman MM, Iobst S, Jesionowski AM, Gill SR.** (2007) Genome-wide transcriptional changes in *Streptococcus gordonii* in response to competence signaling peptide. *J Bacteriol*; **189** (21): 7799-7807.

**Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JC, Sherman DR, Ramakrishnan L.** (2004) Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS Biol*; **2** (11): e367.

**Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, Davis JM, Rawls JF, Ramakrishnan L.** (2010) Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*; **327** (5964): 466-469.

**Way SS, Wilson CB.** (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 homologue in *Listeria monocytogenes* is dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect Immun*; **73** (9): 6151-6153.

**Ween O, Gaustad P, Håvarstein LS.** (1999) Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*; **33** (4): 817-827.

**Weisberg RA, Gottesman ME.** (1999) Processive antitermination. *J Bacteriol*; **181** (2): 359-367.

**Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR.** (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99** (25): 15908-15913.

**Wu LJ, Errington J.** (1994) *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science*; **264** (5158): 572-575.

**Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki LS, Manque P, Ge X, Serrano MG, Puiu D, Hendricks S, Wang Y, Chaplin MD, Akan D, Paik S, Peterson DL, Macrina FL, Buck GA.** (2007) Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. J Bacteriol; **189** (8): 3166-3175.

**Yanofsky C.** (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature; **289** (5800): 751-758.

**Zuker M.** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res; **31** (13): 3406-3415.

## 7 ANHANG

Im Folgenden sind relevante Sequenzausschnitte der in Kapitel 3.35 beschriebenen Dele-  
tionsderivate im ESX-1 Sekretionscluster von *S. oralis* Uo5 gezeigt.

```

esxA5for >
CCTGGTTAAA GCTAGTGGTT CC
taggggaaaag cctgggttaa gctagtgggt cctttgaaac catagatata aatagtgcgtg
atccccctttc ggaccaattt cgatcaccaa ggaaactttg gtatctatgt ttatcacgac
>.....conserved.....>
l g e s l v k a s g s f e t i d t n s a

aagatttttaa caatctattg gcggatgtaa aacaaacatg gaggggaaaag aatgttagtc
ttctaaaatt gttagataac cgctacatt ttgtttgtac ctccccctttc ttacaatcag
>.....conserved.....>
e d f n n l l a d v k q t w r g k n v s
conserved >>.....>
m l v

ctaacggatg aggatacttt aattacaaga gagcaactcg acagaggcgtt caaggaaaaga
gattgcctac tcctatgaaa ttaatgttct ctcggtgagc tgtctccgaa gttcctttct
>.....>> conserved
p n g -
>.....conserved.....>
l t d e d t l i t r e q l d r g f k e r

atgaaggaac aagaacgcca agcagtcagg gccttagtaa ctgcaaaaaga actgtcaatc
tacttccttg ttcttgcggt tcgtcagtcg cggaatcatt gacgttttct tgacagttag
>.....conserved.....>
m k e q e r q a v r a l v t a k e l s i

cttgctaagg gagtggagtt agctaaaaag ttacaagaag cagcctcaga tatgcatgag
gaacgattcc ctcacctcaa tcgatttttc aatgttcttc gtcggagtct atacgtactc
>.....conserved.....>
l a k g v e l a k k l q e a a s d m h e

tacgcttcga agacttatgt aaacaatatt aagggtggat ttgagggcaa ggctgctgat
atgcgaagct tctgaataca ttgtttataa ttcccaccta aactcccggt ccgacgacta
>.....conserved.....>
y a s k t y v n n i k g g f e g k a a d

gctgctgaaa cttacttgac tcagaccatg caaacccta cttacaaaag tccaatcaaa
cgacgacttt gaatgaactg agtctggtag gtttggggat gaaatgtttc aggttagttt
>.....conserved.....>
a a e t y l t q t m q t p t l q s p i k

aactaggaga aaacttgtga tggataaaaa ggaacttcag aaactagagg atgagcataa
ttgatcctct ttggaacct acctattttt ccttgaagtc ttgatctcc tactcgtatt
>...>> conserved
n -
>>.....conserved.....>
m d k k e l q k l e d e h

tcgtaaatta cgagacttag agcgtttaga gatggatttg gatgatgatt tccacaagtt
agcatttaat gctctgaatc tcgcaaatct ctacctaaac ctactactaa aggtgttcaa
>.....conserved.....>
n r k l r d l e r l e m d l d d d f h k

```

```

tagtagggag acggatcatc tcctagaggc gctttcctat gcatgcagag acagtagttt
atcatccctc tgcctagtag aggatctccg cgaaaggata cgtacgtctc tgtcatcaaa
>.....conserved.....>
f s r e t d h l l e a l s y a c r d s s

```

```

tgctgaaatt caaccatata tctttgagat agagaacaat ttggataact atcatcaact
acgactttta gttggtatat agaaactcta tctcttgta aacctattga tagtagttga
>.....conserved.....>
f a e i q p y i f e i e n n l d n y h q

```

```

ttacaagagt cgtatagaga atgtgttgga agctcgtcat caagagaata aaaactttca
aatgttctca gcatatctct tacacaacct tcgagcagta gttctcttat ttttgaaagt
>.....conserved.....>
l y k s r i e n v l e a r h q e n k n f

```

```

tagaaagtta gaagaaaaga acgtttgaca aatatacctt ataaaagaag gatgatatga
atctttcaat cttcttttct tgcaaactgt ttatatggaa tattttcttc ctactatact
>.....conserved.....>
h r k l e e k n v -

```

```

gtttgttata ctttgttatt ataaataaaa aaagaagtaa ttatacaaga aaagtagata
caaacaatat gaaacaataa tatttatatt tttcttcatt aatatgttct tttcatctat

```

```

atttaatctt tcttactagt ttttagatgg aaatagctct tatttttttt ataaatagaa
taaattagaa agaatgatca aaaatctacc tttatcgaga ataaaaaaaa tattttatctt

```

```

taaaaaatga attttaaact tgcaattgag gcaaattatt gatataatga gggcataaat
attttttact taaaatttga acgttaactc cgtttaataa ctatattact cccgtattta

```

```

                                < desxA_rev
                                CCGAAATTA AGTTAATTGT TGTCTTCTTA ACGCGCTTGT
                                desxA_for
                                GGCTTTAAT TCAATTAACA ACAGAAGAAT TGCGCGAACA
taatataaag gagtttcaca tggctttaat tcaattaaca acagaagaat tgcgcgaaca
attatatttc ctcaaagtgt accgaaatta agttaattgt tgtcttctta acgcgcttgt
>>.....desxA.....>
m a l i q l t t e e l r e

```

```

                                desxA_rev
                                TTTGCTGGTT CTAGAACG
                                desxA_for >
                                AAACGACCAA GATCTTGC
aaacgaccaa gatcttgcac cacaaattta atttggtata taagtggctt taggagggcg
ttgctgggt ctagaacgta gtgtttaaat taaacaatat attcaccgaa atcctcccg
>>.....desxA.....>
q n d q d l a s q i -

```

```

agagccttcc tattttttat gacggagaaa atttaaagta atatgaggaa gaatagaatt
tctcggaagg ataaaaaaata ctgcctcttt taaatttcat tatactcctt cttatcttaa
Terminator

```

```

>>.....esaA.....>
m r k n r i

```

```

tttaaataata taggaagtag tctgctggca ttaggattgc ttgcattgat tatttttttg
aaatttatat atccttcacg agacgaccgt aatcctaacg aacgtaacta ataaaaaaac
>.....esaA.....>
f k y i g s s l l a l g l l a l i i f l

```

```

aatctatctg ttcaaaaaaa tacaacgatt agcaatgaaa ataatgcaaa ggctaatacag
ttagatagac aagttttttt atgttgctaa tcgttacttt tattacgttt ccgattagtc
>.....esaA.....>
n l s v q k n t t i s n e n n a k a n q

```

```

cagacaaaat taaatgtagc tatcgtaa at gaagataagc ctgtctacgt agatacaaaa
gtctgtttta atttacatcg atagcattta ctctatttcg gacagatgca tctatgtttt
>.....esxA.....>
  q t k l n v a i v n e d k p v y v d t k

gaatacaatc taggtgctag ttatgtaaaa aatatcgagc gtgataattc acaaaaactgg
cttatgttag atccacgacg aatacatctt ttatagctcg cactattaag tgttttgacc
>.....esxA.....>
  e y n l g a s y v k n i e r d n s q n w

tctgttgctc ctgctggagc agctgattct gggttagaaa gtgggaaata ccaactcgtt
agacaacagg gagcacctcg tcgactaaga cccaatcttt caccctttat ggttgagcaa
>.....esxA.....>
  s v v p r g a a d s g l e s g k y q l v

ttaacaattc ctagtgactt ttctgaaaaa atactcgata ttaacagcat caatgttgat
aattgttaag gatcactgaa aagacttttt tatgagctat aattgtcgta gttacaacta
>.....esxA.....>
  l t i p s d f s e k i l d i n s i n v d

aagacaacca tcaattataa ggtgaatgcg caaggaaatt tgcaagtaga aaatgatgca
ttctgttggt agttaatatt ccacttacgc gttcctttta acgttcatct tttactacgt
>.....esxA.....>
  k t t i n y k v n a q g n l q v e n d a

aataaactag cgaaagatat tgttgctgat ttgaatggc agttagtcga tatgtatatg
ttatttgatc gctttctata acaacgacta aacttaccag tcaatcagct atacatatac
>.....esxA.....>
  n k l a k d i v a d l n g q l v d m y m

< esxA3rev
CGATC GAGTGTCTAT
gctagtattt tgaacaatct ttacactgca caaaagaatg ttcaagctag ctcacagata
cgatcataaa acttggttaga aatgtgacgt gttttcttac aagttcgatc gagtgtctat
>.....esxA.....>
  a s i l n n l y t a q k n v q a s s q i

esxA3rev
GTTTCGCTGG
caagcgacca atactggaaa ctactgtacg aatttatata atacagctat caactctaaa
gttcgctggt tatagccttt gatagcatgc ttaaataat tatgtcgata gttgagattt
>.....esxA.....>
  q a t n i g n y r t n l y n t a i n s k

```

**Abbildung 7.1: Sequenzausschnitt des Deletionsderivates *S. oralis* Uo5  $\Delta$ esxA**

Das *esxA*-Gen wurde mithilfe der Janus-Kassette gegen ein *esxA*-Minigen (rot) in *S. oralis* Uo5 ausgetauscht. Die dargestellte Sequenz verläuft von 5'- in Richtung 3'-Ende. Die Primer sind an ihren Hybridisierungsstellen mit gelber Markierung angezeigt, Annotationen mit Translation in grün unter der entsprechenden DNA-Sequenz. Die Terminatorsequenz zwischen *esxA* und *esxA* ist blau hinterlegt.

CA  
tgaagcgtga agaggtggat gtcattccagc tggcactccc agtttatgga gccaatgaca  
acttcgcact tctccaccta cagtaggtcg accgtgaggg tcaaatacct cggttactgt  
>.....essC.....>  
m k r e e v d v i q l a l p v y g a n d

esxB5for >  
CCCAAGTCCT CAATAACCTA CG  
cccaagtccct caataaccta cgtcaggaag tcgcttccct ccaagaagcc tggaccggac  
gggttcagga gttattggat gcagtccttc agcgaaggga ggttccttcgg acctggcctg  
>.....essC.....>  
t q v l n n l r q e v a s l q e a w t g

agcgcccaag tgccatcccg atgggtgccag aggagttgac gatggatgta tttctcaatc  
tcgcggggttc acggtagggc taccacggtc tctcaactg ctacctacat aaagagttag  
>.....essC.....>  
q r p s a i p m v p e e l t m d v f l n

tgcttacaac tcaagaagcg attcaaaatc atgaattacc gattgcaatt agttgagagg  
acggatgttg agttcttcgc taagttttag tacttaattgg ctaacgttaa tcaacgctcc  
>.....essC.....>  
l p t t q e a i q n h e l p i a i s c e

aagctgagat tatcccaatt aatccatcta cattaaaaaa tattgtagtt ttatcagaag  
ttcgactcta ataggggttaa ttaggttagat gtaatttttt ataacatcaa aatagtcttc  
>.....essC.....>  
e a e i i p i n p s t l k n i v v l s e

gtaagcaatc tcttcagtat acaatttgtc atctagttag tgtaattaat cactgtctag  
cattcgttag agaagtcata tggttaaacag tagatcaatc acattaatta gtgacagatc  
>.....essC.....>  
g k q s l q y t i c h l v s v i n h c l

acaatgggtca tgtattgtta gtagactcta acgaagagta ttcattctta aaagaaaagg  
tgttaccagt acataacaat catctgagat tgcttctcat aagtaagaat tttcttttcc  
>.....essC.....>  
d n g h v l l v d s n e e y s f l k e k

caaatgcata tatttcagga gaagaaatct tagatctatt tagtaatctt gataaggaga  
gtttacgtat ataaagtccct cttcttttaga atctagataa atcattagaa ctattcctct  
>.....essC.....>  
a n a y i s g e e i l d l f s n l d k e

taacaaacag aaaagaaact ccaaaagatg ttcaaacttt catcggttata ccagatttgg  
attgtttgtc ttttctttga ggttttctac aagtttgaaa gtagcaatat ggtctaaacc  
>.....essC.....>  
i t n r k e t p k d v q t f i v i p d l

cttcttttgt tgaaaaagtt totatatctg aagatgattt ttatcaattg tatattaatg  
gaagaaaaca actttttcaa agatatagac ttctactaaa aatagttaac atataattac  
>.....essC.....>  
a s f v e k v s i s e d d f y q l y i n

cttataaata cggctctgcac tttattactg cgggttcaaa atcagtattc ttttaaggtaa  
gaatatttat gccagacgtg aaataatgac gcccaagttt tagtcataag aaattccatt  
>.....essC.....>  
a y k y g l h f i t a g s k s v f f k v

atcctgtgat taaagtcatt aaggaaaata ttacaacagc agttattgct atgcgtttat  
taggacacta atttcagtaa ttctttttat aatgttgtcg tcaataacga tacgcaaata  
>.....essC.....>  
n p v i k v i k e n i t t a v i a m r l



```
atgatcaatc aattgtggaa cacaattcaa ataatagaga gaaaaaatta gagtgggatc
tactagttag ttaacacctt gtgttaagtt tattatctct cttttttaat ctcaccctag
>.....essC.....>
y d q s i v e h n s n n r e k k l e w d
```

```
aagcctatat ttatgataaa ggaagaactc aaaaaagtaa aattaatcaa acaagaaatc
ttcggatata aataactatct ctttcttgag ttttttcatt ttaattagtt tgttcttttag
>.....essC.....>
q a y i y d k g r t q k s k i n q t r n
```

```
gaggaataaaa ttatgtcaga aaaactttac ccattaggaa cagtagtgta tttaaaagaa
ctccttattt aatacagtct ttttgaaatg ggtaatcctt gtcacacat aaattttctt
>.....essC.....>
r g i n y v r k t l p i r n s s v f k r
```

```
ggaacagaaa aactcatggt tatcggtcgt ggggtcgttt accaggatca ggaacaaaaa
ccttgtcttt ttgagtacca atagccagca cccagcaaa tggtcctagt ctttgtttg
>.....essC.....>
r n r k t h g y r s w g r l p g s g n k
```

```
tctgagatgt ttgtagatta tatgggttgt ctttacccaa gtggtatcaa tccaaataat
agactctaca aacatctaata ataccaca gaaatgggtt caccatagtt aggtttatta
>...>> essC
l -
```

```
>>.....esaC.....>
m f v d y m g c l y p s g i n p n n
```

```
acaatattct ttaatcaaga aaatattgat cgagttgttt tcaaagggtt tgtggatgaa
tggtataaga aattagttct tttataacta gctcaacaaa agtttccaaa acacctactt
>.....esaC.....>
t i f f n q e n i d r v v f k g f v d e
```

```
gaggaagaac gtttcataga aatttatcaa aattgggaga agtctcttac gatccctaaa
ctccttcttg caaagtatct ttaaattagtt ttaaccctct tcagagaatg ctagggattt
>.....esaC.....>
e e e r f i e i y q n w e k s l t i p k
```

< esxB\_aph\_uprev

GAAACTACC TCCACCAGCA TCTACCGATT TTACTCTTAT

esxB\_aph\_upfor

CTTTGATGG AGGTGGTCGT AGATGGCTAA AATGAGAATA

```
aagaaaatag attaaacaaa actttgatgg aggtggctgt agatggctaa aatgagaata
ttcttttact taatttggtt tgaaactacc tccaccagca tctaccgatt ttactcttat
>.....esaC....>>
k k i d -
```

```
>>....aphIII.....>
m a k m r i
```

esxB\_aph\_uprev

AGTGG

esxB\_aph\_upfor >

TCACC

```
tcaccggaat tgaaaaaact gatcgaaaaa taccgctgcy taaaagatac ggaaggaatg
agtggcctta acttttttga ctacttttt atggcgacgc attttctatg ctttcttac
>.....aphIII.....>
s p e l k k l i e k y r c v k d t e g m
```

```
tctcctgcta aggtatataa gctgggtggga gaaaatgaaa acctatattt aaaaatgacg
agaggacgat tccatatatt cgaccacct cttttacttt tggatataaa tttttactgc
>.....aphIII.....>
s p a k v y k l v g e n e n l y l k m t
```

```

gacagccggt ataaagggac cacctatgat gtggaacggg aaaaggacat gatgctatgg
ctgtcggcca tatttccttg gtggatacta caccttgccc ttttctgtga ctacgatacc
>.....aphIII.....>
  d s r y k g t t y d v e r e k d m m l w

ctggaaggaa agctgcctgt tccaaaggtc ctgcactttg aacggcatga tggctggagc
gaccttcctt tcgacggaca aggtttccag gacgtgaaac ttgccgtact accgacctcg
>.....aphIII.....>
  l e g k l p v p k v l h f e r h d g w s

aatctgctca tgagtgaggc cgatggcgtc ctttgctcgg aagagtatga agatgaacaa
ttagacgagt actcactccg gctaccgcag gaaacgagcc ttctcatact tctacttggt
>.....aphIII.....>
  n l l m s e a d g v l c s e e y e d e q

agccctgaaa agattatcga gctgtatgcg gagtgcacat ggctctttca ctccatcgac
tcgggacttt tctaatagct cgacatacgc ctcacgtagt ccgagaaagt gaggtagctg
>.....aphIII.....>
  s p e k i i e l y a e c i r l f h s i d

atctcggaatt gtccctatac gaatagctta gacagccgct tagccgaatt ggattactta
tatagcctaa cagggatatg cttatcgaat ctgtcggcga atcggtctaa cctaataaat
>.....aphIII.....>
  i s d c p y t n s l d s r l a e l d y l

ctgaataacg atctggccga tgtggattgc gaaaactggg aagaagacac tccatttaaa
gacttattgc tagaccggct acacctaacg cttttgacct ttcttctgtg aggtaaattt
>.....aphIII.....>
  l n n d l a d v d c e n w e e d t p f k

gatccgcgcg agctgtatga ttttttaaag acggaaaagc ccgaagagga acttgtcttt
ctaggcgcgc tcgacatact aaaaaatttc tgcccttttcg ggcttctcct tgaacagaaa
>.....aphIII.....>
  d p r e l y d f l k t e k p e e e l v f

tcccacggcg acctgggaga cagcaacatc tttgtgaaag atggcaaagt aagtggcttt
agggtgccgc tggaccctct gtcgtttag aaacactttc taccgtttca ttcaccgaaa
>.....aphIII.....>
  s h g d l g d s n i f v k d g k v s g f

attgatcttg ggagaagcgg cagggcggac aagtggatat acattgcctt ctgcgtccgg
taactagaac cctcttcgcc gtcccgctcg ttcaccatac tgtaacggaa gacgcaggcc
>.....aphIII.....>
  i d l g r s g r a d k w y d i a f c v r

tcgatcaggg aggatatcgg ggaagaacag tatgtcgagc tattttttga cttactgggg
agctagtccc tcctatagcc ccttcttgtc atacagctcg ataaaaaact gaatgacccc
>.....aphIII.....>
  s i r e d i g e e q y v e l f f d l l g

< esxB_aph_downrev
G ACCTACTTAA CAAAATCCCC
  esxB_aph_downfor
C TGGATGAATT GTTTTAGGGG
atcaagcctg attgggagaa aataaaatat tatattttac tggatgaatt gttttagggg
tagttcggac taaccctctt ttattttata atataaaatg acctacttaa caaaatcccc
>.....aphIII.....>>
  i k p d w e k i k y y i l l d e l f -

```

```

esxB_apb_downrev
CCTTATACTG ATGATAGTTC
esxB_apb_downfor >
GGAATATGAC TACTATCAAG
ggaatatgac tactatcaag atggacaaag aaacatttgt atcatcgggt gagaaattga
ccttatactg atgatatgtt tacctgtttc tttgttaaaca tagtagccaa ctctttaact
>>.....hypothetical.....>
  m t t i k m d k e t f v s s v e k l

tacaaaacgt tgataattat acaaaaagtg tgacaacttc tgcttcccaa tttagtttat
atgttttgca actattaata tgtttttcac actgttgaag acgaagggtt aaatcaaata
>.....hypothetical.....>
  i q n v d n y t k s v t t s a s q f s l

ttcaaagtga tttgttgggg gacggctata ctaaattatt taataaagta gattcagaat
aagtttctact aaacaacccc ctgccgatat gatttaataa attatttcat ctaagtctta
>.....hypothetical.....>
  f q s d l l g d g y t k l f n k v d s e

taaaaaaacc aaaagctctt agtggcagaa tgcattgtat tgtctgaaag tgcaaaaagt
atTTTTTTTgg ttttcgagaa tcaccgtctt acgtaacata acgactttc acgtttttca
>.....hypothetical.....>>
  l k k p k a l s g r m h c i v -

tttgctgaag agatttcgtc tgcgtgaatct tctgtttcat tttgagtga gggggataga
aaacgacttc tctaaagcag acgacttaga agacaaagta aaactcactt cccctatct

ttatggcaga aataaaatat atcgcagatc aacataaaca gtttcaagat gagttacaaa
aataccgtct tttttttata tagcgtctag ttgtatttgt caaagttcta ctcaatgttt
>>.....hypothetical.....>
  m a e i k y i a d q h k q f q d e l q

aaattgggga tgggtttgat aacctgatta cagaattagg gaatgttaaa acatccgtta
tttaaccctt acccaaacta ttggactaat gtcttaatcc cttacaattt tgtaggcaat
>.....hypothetical.....>
  k i g d g f d n l i t e l g n v k t s v

gttcaaactt taagggtgaa gcagctactg cattggaaac tgcaattaat gatttaactg
caagtttaga attccactt cgtcgtatgac gtaacctttg acgttaatta ctaaatgtac
>.....hypothetical.....>
  s s n l k g e a a t a l e t a i n d l t

caaaattaac aaaaagcaaa gactaattgg catacgacca atgaaaatgc gaaaaaagta
gttttaattg tttttcgttt ctgattaacc gtatgctggt tactttttacg cttttttcat
>.....hypothetical.....>>
  a k l t k s k d -

gaagagatca tcaaaaaagc agatgaagat gctaagaaga tagtggatga gcagaaataa
cttctctagt agttttttcg totacttcta cgattcttct atcacctact cgtctttatt

ggaggatttg catggctgat ggagtattta caattccaat gagtgagtat tacagtaaat
cctcctaaac gtaccgacta cctcataaat gtttaaggta ctactcata atgtcattta
>>.....hypothetical.....>
  m a d g v f t i p m s e y y s k

caagtgaact taaggggaaa gtttcagatt tgattactga tgttgaaaat aattttttta
gttcaactga attccctttt caaagtctaa actaatgact acaactttta ttaaaaaatt
>.....hypothetical.....>
  s s e l k g k v s d l i t d v e n n f l

```

```

gtaagggttag tgcgaatatt gatacactgg atgaacaaga tatcagtgtt gtagaaggct
cattccaatc acgcttataa ctatgtgacc tacttggttct atagtcacaa catcttccga
>.....hypothetical.....>
s k v s a n i d t l d e q d i s v v e g

ttgcctctta tacgaacgct aagagcaaat tagaaactct gaaagaatat gagacacaac
aacggagaat atgcttgcca ttctcggtta atctttgaga ctttcttata ctctgtgttg
>.....hypothetical.....>
f a s y t n a k s k l e t l k e y e t q

taacgaagat gtcctcggaa ggagatagca atcctctaaa tggagtgggtg agtctagata
attgcttcta caggagcctt cctctatcgt taggagattt acctcaccac tcagatctat
>.....hypothetical.....>
l t k m s s e g d s n p l n g v v s l d

                                     < esxB3rev
                                     CCTCG TCTGAGAGTT TGCC
aacagtatag cgccaagttt ttggatgttt caaaaggagc agactctcaa acggttgcac
ttgtcatatc gcggttcaaa aacctacaaa gttttcctcg tctgagagtt tgccaacgta
>.....hypothetical.....>
k q y s a k f l d v s k g a d s q t v a

```

### Abbildung 7.2: Sequenzausschnitt des Deletionsderivates *S. oralis* Uo5 *esxB::aphIII*

Das *esxB*-Gen wurde durch die Kanamycin-Resistenzkassette *aphIII* (rot) in *S. oralis* Uo5 ausgetauscht. Die dargestellte Sequenz verläuft von 5'- in Richtung 3'-Ende. Die Primer sind an ihren Hybridisierungsstellen mit gelber Markierung angezeigt, Annotationen mit Translation in grün unter der entsprechenden DNA-Sequenz.

```

                                     essCupfor
                                     CCTGTGACTT
gaatccgttt ggccctaaac gtttttcgtc tagagggcgc cttggagtta cctgtgactt
cttaggcaaa ccgggatttg caaaaagcag atctcccgcg gaacctcaat ggacactgaa
>.....essB.....>
r i r l a l n v f r l e g a l e l p v t

essCupfor >
TCCTTTTGCA CC
tccttttgca ccagtaaat ctctttatta ccaaggatgc tcaggctaag attgcttatac
aggaaaacgt gggtcattta gagaaataat ggttcctacg agtccgattc taacgaatag
>.....essB.....>
f l l h p v n l f i t k d a q a k i a y

gtggaattcc tggctgatg gttcctcaat caatatcctc agaagatttt ttacgccagg
caccttaagg accagactac caaggagtta gttataggag tcttctaaaa aatgcggtcc
>.....essB.....>
r g i p g l m v p q s i s s e d f l r q

ctaaatgttt tacagtaaca ctatttagcg atttggattt catggatctt tataatgggt
gatttacaaa atgtcattgt gataaatcgc taaacctaaa gtacctagaa atattaccaa
>.....essB.....>
a k c f t v t l f s d l d f m d l y n g

ccttggaaatt agagaccttg cccgacttct taaatgacct atgtcaggca gatgatatatg
ggaaccttaa tctctggaac gggctgaaga atttactgga tacagtccgt ctactatatc
>.....essB.....>
s l e l e t l p d f l n d l c q a d d i

```

```

aggctgcagt agctgttttg gagaagtact acacggagaa ggctgcgaaa gaacgggcag
tccgacgtca tcgacaaaac ctcttcatga tgtgcctctt ccgacgcttt cttgcccgctc
>.....essB.....>
e a a v a v l e k y y t e k a a k e r a

atttggctctt ggttccaagt agacgccatc gtgtctttta actggcaacg atttgggttaa
taaaccagaa ccaaggttca tctgcggtag cacagaaatt tgaccgttgc taaaccaatt
>.....essB.....>
d l v l v p s r r h r v f k l a t i w l

cagccagcgt tttcttggtg atcgttccac ttatctatct gatttttgtg caaaatcctt
gtcggctcgca aaagaacaac tagcaagggtg aatagataga ctaaaaacac gtttttaggaa
>.....essB.....>
t a s v f l l i v p l i y l i f v q n p

tcaaagaaaa gatgttgcag gcagatactg cttttattaa agtggattat agtgggttta
agtttctttt ctacaacgtc cgtctatgac ggaaataatt tcacctaata tcaccacaat
>.....essB.....>
f k e k m l q a d t a f i k v d y s g v

ttacagaatt agagagaatt gatccagcta gcttgccgaa tacgcaaaag tatgagttgg
aatgtcttaa tctctcttaa ctaggtcgat cgaacggctt atgcgttttc atactcaacc
>.....essB.....>
i t e l e r i d p a s l p n t q k y e l

cttactctta tattcagggg ttggaatttt cttctgaaca aaagaaagtc atcctgaata
gaatgagaat ataagtcccc aaccttaaaa gaagacttgt tttctttcag taggacttat
>.....essB.....>
a y s y i q g l e f s s e q k k v i l n

atgtaacact taagtcagat gagctttatt tgacttactg gatccagggtt gggcgcaatc
tacattgtga attcagttca ctcgaaataa actgaatgac ctaggtccaa cccgcgttag
>.....essB.....>
n v t l k s d e l y l t y w i q v g r n

gttttgaaga ggctcttgat attgccaaac ggattaacga cagtgacttg attctctatg
caaaacttct ccgagaacta taacggtttg ctaattgct gtcactgaac taagagatac
>.....essB.....>
r f e e a l d i a k r i n d s d l i l y

ctttgactca ggaaatcaag caggttcgag aagatggaaa cttgtcaggg aaagaccgtg
gaaactgagt ctttagttc gtccaagctc ttctaccttt gaacagtccc tttctggcac
>.....essB.....>
a l t q e i k q v r e d g n l s g k d r

aaagtaagtt gaatactttg gaaagcgagt ataagaaata ctgggatagt cgaagtgagc
tttcattcaa cttatgaaac ctttcgctca tattctttat gaccctatca gtttcaactc
>.....essB.....>
e s k l n t l e s e y k k y w d s r s e

tactaacgag tgaatcaagc tccaatgctt ctacaactcc taaccctcaa gataaggctt
atgattgctc acttagttcg aggttacgaa gatgttgagg attgggagtt ctattccgaa
>.....essB.....>
l l t s e s s s n a s t t p n p q d k a

ctgaaagcaa accgtcatct gagaagaaac ctgttccaag tagctcctct agcaattaaa
gactttcggtt tggcagtaga ctcttctttg gacaaggttc atcgaggaga tcgttaattt
>.....essB.....>
s e s k p s s e k k p v p s s s s s n -

```

```

                                < dEssCrev
                                G TTTAGTAAAA GATGTCGGTT CCAGACGCAA
                                dEssCfor
                                C AAATCATTTT CTACAGCCAA GGTCTGCGTT
gtagaccaag gagagaaatt atgaaaaaac aaatcatttt ctacagccaa ggtctgcggt
catctgggtc ctctctttta tacttttttg tttagtaaaa gatgtcgggt ccagacgcaa
>>.....essC Minigen.....>
    m k k q i i f y s q g l r

dEssCrev
ATGGTCCTAG TCCTTTGTTT GAG
dEssCfor >
TACCAGGATC AGGAAACAAA CTC
taccaggatc aggaaacaaa ctctgagatg tttgtagatt atatggggtg tctttaccca
atggtcctag tcctttggtt gagactctac aaacatctaa tataaccaac agaaatgggt
>.....essC Minigen.....>
    l p g s g n k l -
                                >>.....esaC.....>
                                m f v d y m g c l y p

agtggatatca atccaaataa tacaatatc tttaatcaag aaaatattga tcgagttggt
tcaccatagt taggtttatt atgttataag aaattagttc ttttataact agctcaacaa
>.....esaC.....>
    s g i n p n n t i f f n q e n i d r v v

ttcaaagggt ttgtggatga agaggaagaa cgtttcatag aaatttatca aaattgggag
aagtttccaa aacacctact tctccttctt gcaaagtatc tttaaatagt tttaaccctc
>.....esaC.....>
    f k g f v d e e e r f i e i y q n w e

aagtctctta cgatccctaa aaagaaaata gattaaacaa aactttgatg gaggtgggtcg
ttcagagaat gctagggatt tttcttttat ctaatttggt ttgaaactac ctccaccagc
>.....esaC.....>
    k s l t i p k k k i d -

tagatgaatt ataaggaaag aattgctgct ttgaatactt ttaaaactgc cataacagaa
atctacttaa tattcctttc ttaacgacga aacttatgaa aattttgacg gtattgtctt
>>.....esxB.....>
    m n y k e r i a a l n t f k t a i t e

ggagatacga cagatagtgt atcaggtggt tctacagatg tttctgggtg ggaaggtaat
cctctatgct gtctatcaca tagtccacaa agatgtctac aaagaccaac ccttccatta
>.....esxB.....>
    g d t t d s v s g v s t d v s g w e g n

gctgattcga agtttgatga ttatgttcta acaattaagg ccgactgtgc agatattttct
cgactaagct tcaaactact aatacaagat tgtaatttcc ggctgacacg tctataaaga
>.....esxB.....>
    a d s k f d d y v l t i k a d c a d i s

gccaaaaagg caagttttct cagtgaggtt gatgggagaa tatcccaa tcaagcgatg
cggtttttcc gttcaaaaga gtcactccaa ctaccctctt ataggggtta agttcgctac
>.....esxB.....>
    a k k a s f l s e v d g r i s q i q a m

tttgatcttg acgttgcttt aaatagttgg agattgggta tgggtgtacga ttcaaaagat
aaactagaac tgcaacgaaa tttatcaacc tctaaccat accacatgct aagttttcta
>.....esxB.....>
    f d l d v a l n s w r l g m v y d s k d

```

```

tcggcaaaca ataaagctct agtatatgat tctattagcc aagctgattt ggattcgagt
agccgtttgt tatttcgaga tcatatacta agataatcgg ttcgactaaa cctaagctca
>.....esxB.....>
  s a n n k a l v y d s i s q a d l d s s

gtacgtgatt atctattgac tatggtttat taggggggaa tatgactact atcaagatgg
catgcactaa tagataactg ataccaaata atccccctt atactgatga tagttctacc
>.....esxB.....>
  v r d y l l t m v y -
                                     >>..hypothetical...>
                                     m t t i k m

acaaagaaac atttgatatca tcggttgaga aattgatata aaacgttgat aattatacaa
tgtttctttg taaacatagt agccaactct ttaactatgt tttgcaacta ttaatatgtt
>.....hypothetical.....>
  d k e t f v s s v e k l i q n v d n y t

aaagtgtgac aacttctgct tcccaattta gtttatttca aagtgatttg ttgggggacg
tttcacactg ttgaagacga aggggttaa atcaataaagt ttcactaaac aacccccctg
>.....hypothetical.....>
  k s v t t s a s q f s l f q s d l l g d

gctatactaa attatttaaat aaagtagatt cagaattaaa aaaacaaaaa gctcttagtg
cgatatgatt taataaatta ttctacttaa gtcttaattt ttttggtttt cgagaatcac
>.....hypothetical.....>
  g y t k l f n k v d s e l k k p k a l s

gcagaatgca ttgtattgtc tgaaagtgca aaaagttttg ctgaagagat ttcgtctgct
cgtcttacgt aacataacag actttcacgt ttttcaaac gacttctcta aagcagacga
>.....hypothetical.....>
  g r m h c i v -

gaatcttctg ttctattttg agtgaagggg gatagattat ggcagaaata aaatatatcg
cttagaagac aaagtaaaac tcacttcccc ctatctaata ccgtctttat tttatatagc
                                     >>....hypothetical.....>
                                     m a e i k y i

                                     < essCdownrev
                                     CCTACCC AAACCTATTGG
cagatcaaca taaacagttt caagatgagt tacaaaaaat tggggatggg tttgataacc
gtctagtgtt atttgtcaaa gttctactca atgtttttta acccctaccc aaactattgg
>.....hypothetical.....>
  a d q h k q f q d e l q k i g d g f d n

essCdownrev
ACTAATGTC
tgattacaga attaggggaat gttaaaacat ccgtagtttc aaatcttaag ggtgaagcag
actaatgtct taatccctta caattttgta ggcaatcaag tttagaattc ccacttcgct
>.....hypothetical.....>
  l i t e l g n v k t s v s s n l k g e a

```

### Abbildung 7.3: Sequenzausschnitt des Deletionsderivates *S. oralis* Uo5 ΔessC

Das *essC*-Gen wurde mithilfe der Janus-Kassette gegen ein *essC*-Minigen (rot) in *S. oralis* Uo5 ausgetauscht. Die dargestellte Sequenz verläuft von 5'- in Richtung 3'-Ende. Die Primer sind an ihren Hybridisierungsstellen mit gelber Markierung angezeigt, Annotationen mit Translation in grün unter der entsprechenden DNA-Sequenz.

```

esxA5for >
CCTGGTTAAA GCTAGTGGTT CC
taggggaaag cctgggttaa gctagtgggt cctttgaaac catagataca aatagtgctg
atcccccttc ggaccaatct cgatcaccaa ggaaactttg gtatctatgt ttatcacgac
>.....conserved.....>
l g e s l v k a s g s f e t i d t n s a

aagattttaa caatctattg gcggatgtaa aacaaacatg gaggggaaag aatgttagtc
ttctaaaatt gttagataac cgctacatt ttgtttgtac ctcccccttc ttacaatcag
>.....conserved.....>
e d f n n l l a d v k q t w r g k n v s
conserved >>.....>
m l v

ctaacggatg aggatacttt aattacaaga gagcaactcg acagaggctt caaggaaaga
gattgcctac tcctatgaaa ttaatgttct ctggttgagc tgtctccgaa gttcctttct
>.....>> conserved
p n g -
>.....conserved.....>
l t d e d t l i t r e q l d r g f k e r

atgaaggaac aagaacgcca agcagtcagg gccttagtaa ctgcaaaaaga actgtcaatc
tacttccttg ttcttgcggt tcgtcagtc ccgaatcatt gacgttttct tgacagttag
>.....conserved.....>
m k e q e r q a v r a l v t a k e l s i

cttgctaagg gagtggagtt agctaaaaag ttacaagaag cagcctcaga tatgcatgag
gaacgattcc ctacactcaa tcgatttttc aatgttcttc gtcggagtct atacgtactc
>.....conserved.....>
l a k g v e l a k k l q e a a s d m h e

tacgcttcga agacttatgt aaacaatatt aagggtggat ttgagggcaa ggctgctgat
atgcgaagct tctgaataca ttgtttataa ttcccaccta aactcccggt ccgacgacta
>.....conserved.....>
y a s k t y v n n i k g g f e g k a a d

gctgctgaaa cttacttgac tcagaccatg caaacccta cttacaaaag tccaatcaaa
cgacgacttt gaatgaactg agtctggtac gtttggggat gaaatgtttc aggttagttt
>.....conserved.....>
a a e t y l t q t m q t p t l q s p i k

aactaggaga aaacttgtga tggataaaaa ggaacttcag aaactagagg atgagcataa
ttgatctctt ttgaacact acctattttt ccttgaagtc ttgatctcc tactcgtatt
>...>> conserved
n -
>>.....conserved.....>
m d k k e l q k l e d e h

tcgtaaatta cgagacttag agcgtttaga gatggatttg gatgatgatt tccacaagtt
agcatttaat gctctgaatc tcgcaaactc ctacctaaac ctactactaa aggtgttcaa
>.....conserved.....>
n r k l r d l e r l e m d l d d d f h k

tagtagggag acggatcatc tcctagaggc gctttcctat gcatgcagag acagtagttt
atcatccctc tgcctagtag aggatctccg cgaaaggata cgtacgtctc tgcctacaaa
>.....conserved.....>
f s r e t d h l l e a l s y a c r d s s

tgctgaaatt caaccatata tctttgagat agagaacaat ttggataact atcatcaact
acgactttta gttggtatat agaaactcta tctcttgta aacctattga tagtagttga
>.....conserved.....>
f a e i q p y i f e i e n n l d n y h q

```



```

ttacaagagt cgtatagaga atgtgttgga agctcgatcat caagagaata aaaactttca
aatgtttctca gcatatctct tacacaacct tcgagcagta gttctcttat ttttgaaagt
>.....conserved.....>
l y k s r i e n v l e a r h q e n k n f

tagaaagtta gaagaaaaga acgtttgaca aatatacctt ataaaagaag gatgatatga
atctttcaat cttcttttct tgcaaactgt ttatatggaa tattttcttc ctactatact
>.....conserved.....>
h r k l e e k n v -

gtttgttata ctttgttatt ataaataaaa aaagaagtaa ttatacaaga aaagtagata
caaacaatat gaaacaataa tattttatatt tttcttcatt aatatgttct tttcatctat

atttaattctt tcttactagt ttttagatgg aaatagctct tatttttttt ataaatagaa
taaattagaa agaattgatca aaaatctacc tttatcgaga ataaaaaaa tatttatctt

taaaaaatga attttaaact tgcaattgag gcaaattatt gatataatga gggcataaat
attttttact taaaatttga acgttaactc cgtttaataa ctatattact cccgtattta

taatataaag gagtttcaca tggctttaat tcaattaaca acagaagaat tgcgcacctc
attatatatt ctcaaagtgt accgaaatta agttaattgt tgtcttctta acgcgtggag
>>.....esxA.....>
m a l i q l t t e e l r t

tgctcaaaag tacactcaag gttctgagga agtaagacaa gtacttcgta cattgactca
acgagttttc atgtgagttc caagactcct tcattctggt catgaagcat gtaactgagt
>.....esxA.....>
s a q k y t q g s e e v r q v l r t l t

agagcaaaat actatccgag acaactggaa aggtgctgct tttgagagct ttgatcgcca
tctcgtttta tgataggctc tgttgacctt tccacgacga aaactctcga aactagcggg
>.....esxA.....>
q e q n t i r d n w k g a a f e s f d r

attcacagaa ttgtctccaa aaattgagga gtttgcaact ttgcttgatg agatcaatgc
taagtgtctt aacagagggt tttaactcct caaacgttga aacgaactac tctagttacg
>.....esxA.....>
q f t e l s p k i e e f a t l l d e i n

acagttgaac aaggttgctg aaattgttga acaaaacgac caagatcttg catcacaaat
tgtcaacttg ttccaacgac tttaacaact tgttttgctg gttctagaac gtagtgttta
>.....esxA.....>
a q l n k v a e i v e q n d q d l a s q

< esxA_ter_rev
CACC GAAATCCTCC CGCTCTATAA AAAATACTGC CTC
esxA_ter_for >
GTGG CTTTAGGAGG GCGAGATATT TTTTATGACG GAG
ttaatttggt atataagtgg ctttaggagg gcgagatatt ttttatgacg gagaaaaattt
aattaaacaa tatattcacc gaaatcctcc cgctctataa aaaaactactgc ctcttttaaa
ΔTerminator

>.>> esxA
i -

aaagtaatat gaggaagaat agaattttta aatatatagg aagtagtctg ctggcattag
tttcattata ctcttcttta tcttaaaaaat ttatatatcc ttcattcagac gaccgtaatc
>>.....esaA.....>
m r k n r i f k y i g s s l l a l

```

```

gattgcttgc attgattatt tttttgaatc tatctgttca aaaaaataca acgattagca
ctaacgaacg taactaataa aaaaacttag atagacaagt ttttttatgt tgctaatacgt
>.....esA.....>
g l l a l i i f l n l s v q k n t t i s

atgaaaataa tgcaaaggct aatcagcaga caaaattaaa tgtagctatc gtaaatgaag
tacttttatt acgtttccga ttagtcgtct gttttaattt acatcgatag catttacttc
>.....esA.....>
n e n n a k a n q q t k l n v a i v n e

ataagcctgt ctacgtagat acaaaagaat acaatctagg tgctagttat gtaaaaaata
tattcggaac gatgcatac tgttttctta tgtagatcc acgatcaata cattttttat
>.....esA.....>
d k p v y v d t k e y n l g a s y v k n

tcgagcgtga taattcacia aactgggtctg ttgtccctcg tggagcagct gattctgggt
agctcgact attaatgtgt ttgaccagac aacagggagc acctcgatga ctaagaccca
>.....esA.....>
i e r d n s q n w s v v p r g a a d s g

tagaaagtgg gaaataccaa ctggttttaa caattcctag tgacttttct gaaaaaatac
atctttcacc ctttatgggt gagcaaaatt gttaaggatc actgaaaaga cttttttatg
>.....esA.....>
l e s g k y q l v l t i p s d f s e k i

tcgatattaa cagcatcaat gttgataaga caaccatcaa ttataagggt aatgcgcaag
agctataatt gtcgtagtta caactattct gttggtagtt aatattccac ttacgcgttc
>.....esA.....>
l d i n s i n v d k t t i n y k v n a q

gaaatttgca agtagaaaat gatgcaaata aactagcgaa agatattgtt gctgatttga
ctttaaacgt tcatttttta ctacgtttat ttgatcgctt tctataacaa cgactaaact
>.....esA.....>
g n l q v e n d a n k l a k d i v a d l

atggtcagtt agtcgatatg tatatggcta gtattttgaa caatctttac actgcacaaa
taccagtcaa tcagctatac atataccgat cataaaactt gttagaaatg tgacgtgttt
>.....esA.....>
n g q l v d m y m a s i l n n l y t a q

< esxA3rev
CGATCGAGT GTCTATGTTT GCTGG
agaatgttca agctagctca cagatacaag cgaccaatat cggaaactat cgtacgaatt
tcttacaagt tcgatcgagt gtctatgttc gctgggtata gcctttgata gcatgcttaa
>.....esA.....>
k n v q a s s q i q a t n i g n y r t n

```

#### Abbildung 7.4: Sequenzausschnitt des Deletionsderivates *S. oralis* Uo5 Δter\_esxA

Mithilfe der Janus-Kassette wurden 7 Basen des Terminators (blau hinterlegt) zwischen esxA und esA in *S. oralis* Uo5 deletiert (vgl. Abbildung 7.1). Die dargestellte Sequenz verläuft von 5′- in Richtung 3′-Ende. Die Primer sind an ihren Hybridisierungsstellen mit gelber Markierung angezeigt, Annotationen mit Translation in grün unter der entsprechenden DNA-Sequenz.

## DANKSAGUNG

Endlich ist es geschafft – und ich bin stolz! Aber es gibt einige Menschen, die maßgeblich dazu beigetragen haben und denen ich sehr dankbar für ihre Unterstützung bin.

Zunächst gilt mein Dank natürlich Regine dafür, dass ich die letzten Jahre in ihrer Abteilung verbringen durfte, aber auch für die Denkanstöße und die Motivation, was letztlich das „Überleben“ dieses Themas sicherte.

Prof. Dr. Matthias Hahn danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission und Prof. Dr. John Cullum für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön geht an Patrick, für die Beantwortung wissenschaftlicher Fragen und für deine Unterstützung und Ratschläge in den letzten Jahren.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und dafür gesorgt haben, dass ich mich im Labor wohl gefühlt habe. Dabei sind mir einige Menschen besonders ans Herz gewachsen: Danke an Anke, Julia, Miriam, Patrick und Uli für schöne drei Jahre auch neben der Arbeit. Ich hoffe, dass wir uns nicht aus den Augen verlieren.

Vielen Dank an meine beste Freundin Sophia, für das Daumen-drücken und die wunderbare Freundschaft. Es ist toll, solche Freunde zu haben!

Ein herzliches Dankeschön gehört meiner Familie. Danke Mama und Papa für euer Interesse und die ausnahmslose Unterstützung in allen Situationen. Ohne euch wäre ich niemals so weit gekommen.

Dir Oliver danke ich dafür, dass du auch in der letzten nicht immer einfachen Zeit für mich da warst. Du hast mir den nötigen Rückhalt gegeben.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name Tina Becker

## Schul- und Berufsausbildung

seit 09/2008	TU Kaiserslautern Promotion in Biologie am Lehrstuhl Mikrobiologie Thema der Dissertation: „Das ESX-Sekretionscluster von <i>Streptococcus oralis</i> “
04/2003 - 06/2008	TU Kaiserslautern Studium der Biologie (Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Allgemeine Zoologie, Biochemie) Abschluss: Diplom (Durchschnittsnote 1,1) Thema der Diplomarbeit: „Interspezies-Gentransfer zwischen <i>Streptococcus pneumoniae</i> und <i>Streptococcus oralis</i> “, Lehrstuhl Mikrobiologie, TU Kaiserslautern
07/1994 – 03/2003	St. Franziskus Gymnasium Kaiserslautern Abschluss: Abitur (Durchschnittsnote 1,8)

## Berufliche Tätigkeiten

seit 09/2008	TU Kaiserslautern wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion, Lehrstuhl Mikrobiologie
--------------	--